

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Neurosciences Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Elodie BARAT

Thèse dirigée par **le Dr Mireille ALBRIEUX**

préparée au sein du **Laboratoire Dynamique et Physiopathologie
des Ganglions de la Base Inserm U836**

dans **l'École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Etude des interactions entre neurones et astrocytes au sein de la substance noire réticulée

Thèse soutenue publiquement le **5 octobre 2012**, devant le jury composé de :

Pr Rémy SADOUL

Professeur à l'université de Grenoble, GIN-Inserm U836, Grenoble, Président
du jury

Dr Christian GIAUME

DR CNRS, Collège de France, CIRB, CNRS 7241 / Inserm U1050, Paris,
Rapporteur

Dr Paolo GUBELLINI

CR CNRS, IBDML, UMR7288, Marseille, Rapporteur

Dr Laurent VENANCE

DR Inserm, Collège de France, CIRB, CNRS 7241 / Inserm U1050 Paris,
Examineur

Dr Mireille ALBRIEUX

Maître de conférence à l'université Joseph Fourier, GIN-Inserm U836,
Grenoble, Directrice de thèse

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*



Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut des Neurosciences de Grenoble (Inserm U836) dans l'équipe « Dynamique et Physiopathologie des Ganglions de la Base » dirigée par le docteur Marc Savasta.

Je tiens tout d'abord à remercier **Marc Savasta** qui, en m'accueillant dans son laboratoire m'a permis de réaliser cette thèse. Merci d'avoir offert aux astrocytes une petite place dans ton monde des mécanismes de la stim... Merci également pour les opportunités offertes, que ce soit en congrès ou lors de formations, qui m'ont permis d'élargir ma culture scientifique.

J'adresse ma gratitude à l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse. Merci aux Dr **Paolo Gubellini**, **Christian Giaume**, **Laurent Venance** ainsi qu'au Pr **Rémy Sadoul**, le président de ce jury. J'en profite pour lui confier que c'est depuis son UE de neuro en licence, que j'ai décidé de m'orienter vers les neurosciences...

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse **Mireille**. Tu m'as dit il n'y a pas si longtemps qu'il fallait que je te fasse « descendre de ce piédestal ». Et bien je suis désolée mais je n'ai pas vraiment réussi... Tu es pour moi une enseignante hors-pair, un très bon chercheur tout en restant une personne intègre et au grand cœur. Par où commencer et comment ne rien oublier ? La richesse de tes connaissances scientifiques a été une chance et je l'avoue, un vrai modèle pour moi. Tu m'as énormément appris tout au long de ces cinq années passées à tes côtés. Merci pour tes encouragements, tes conseils, ton professionnalisme et ton honnêteté. Merci d'avoir été là jusqu'au bout. Sur un plan plus personnel, j'ai beaucoup apprécié chacun des moments passés ensemble. Ces différentes discussions, ces moments de partage, de confidences, de complicité et de rires (oui merci d'avoir ri à toutes mes blagues...ça ce n'était pas facile !)... Je te souhaite l'épanouissement scientifique que tu mérites. Notre rencontre restera pour moi, bien plus qu'une aventure professionnelle.

Merci aux membres de l'équipe 10. **Véro** pour son écoute et ses conseils. **Anne** pour sa jovialité et sa gentillesse. **Audrey**, **Murielle**, **Nathalie**, **Mathieu**, **Sabrina**. Merci et bonne chance aux « petits nouveaux » Marta, Théo et Anthony.

Je voudrais remercier chaleureusement les membres de l'équipe 9 : **Antoine**, **Colin**, **Tanguy**, **Sophie**, **Sabine**, **Séverine** et **Isa**. Merci de vos encouragements, de votre sympathie, de votre intérêt envers mes travaux lors des neurodocs ou de discussions. Je garderai de très bons souvenirs des moments partagés au début de ma thèse !

J'adresse également mes remerciements à mes collègues et amis **Benoît** et **Julien**, pour ces moments de partages professionnels mais surtout personnels, pour nos séances de grimpe et randos.

Durant ma thèse, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes qui m'ont enrichie. Des personnes qui m'ont offert l'occasion de découvrir, d'apprendre et de partager par simple amour de la science. Ainsi, je tiens à remercier **Catherine Guezzi**, qui m'a offert ma première expérience d'enseignement. **Michel Desarmenien**, qui m'a fait découvrir que l'électrophysiologie n'était pas une langue étrangère... Un grand merci à **Jean-Claude Platel** pour ses conseils et son écoute. Ton arrivée a été une vraie bouffée d'oxygène !... Merci de l'intérêt que tu as porté à ce travail sur le plan technique comme bibliographique. Ton aide durant ma thèse m'a été très précieuse! Merci aussi pour ta disponibilité, ton écoute et tes conseils.

Durant ma thèse j'ai eu l'opportunité d'apprendre la technique du patch-clamp au Collège de France à Paris. A chacun de mes séjours parisiens j'ai toujours été chaleureusement accueillie. J'ai vraiment apprécié ces petits séjours à vos côtés, merci à tous pour votre gentillesse et votre disponibilité ! Merci à **Elodie** pour ton aide, tes conseils et ton écoute, **Anne-Marie** pour tes révélations de biocytine !! **Marie, Yves, Marie-Lou, Sylvie, Yao...** Merci également à **Yihui** pour sa musique et le reste... !

Enfin je remercie très sincèrement **Laurent Venance**. Je ne sais pas pourquoi tu as accepté de me recevoir autant de fois dans ton équipe, probablement parce que mes supers blagues te manquaient... Je te suis vraiment reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi. Dès le début de ma thèse et chaque année tu m'as accueillie, consacré du temps et beaucoup appris. Tu t'es toujours rendu disponible pour moi. Un grand merci pour ton écoute et tes conseils, merci de l'intérêt que tu as porté à mes travaux ainsi qu'à mon avenir professionnel. L'opportunité que tu m'as offerte a été une vraie chance pour moi ! Je te dois beaucoup dans la réalisation de cette thèse et dans ma volonté de poursuivre dans cette voie. Enfin merci de ton intégrité, ta joie de vivre, ton naturel et ta vision de la recherche... To be continued...

Certaines personnes que l'on rencontre sont des cadeaux que le destin nous fait. Des personnes qui, grâce à leur bonté d'âme vous apportent beaucoup. Je ne sais comment exprimer la gratitude et la tendresse que je te porte **Sylvie**. Toujours disponible et à l'écoute, tu as énormément contribué à la réalisation de ma thèse. Sur le plan professionnel tu as toujours été disponible et enthousiaste. Ton aide et ton expérience m'ont été très précieuses et heureusement que j'ai pu partager avec toi, ces longues périodes où les astrocytes ne nous « causaient » plus... Merci pour ta bonne humeur quotidienne et ta bonté. Merci de m'avoir tant écoutée, soutenue et encouragée. Ces moments privilégiés passés avec toi font partie des meilleurs souvenirs de cette thèse.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont partagés ma vie ou plus récemment ces dernières années et qui m'ont, chacune à leur façon, permis de mener à bien cette thèse. Merci à mes **grands parents** « chti » et à ma grand-mère **Hélène**, merci à **Christian** mon pianiste attitré... Merci à la famille **Noël**, à **Ugo**, à **Alexis**. Merci à la famille **Gory** et tout particulièrement à toi **Dominique**, pour tes accueils toujours si chaleureux. Merci pour toutes ces discussions, ces échanges à Paris ou dans les montagnes...

Merci à mes amis **Niko** et **Sophie**, **Hélène**, **Tom**, **Gaëtan** et **Corine**. Merci à vous pour tous ces bons moments en falaises, en VTT en randos et tout le reste... Enfin j'adresse toute mon affection à **Lydie** et **Mélanie**. Merci pour tout, pour ces moments de rires et de partages, pour votre soutien et vos encouragements. Merci d'avoir changé ma vision de l'amitié...

J'adresse mes remerciements et tout mon amour à ma sœur **Anaïs** et mon frère **Jolan**. Merci pour tous ces moments de complicité qui n'appartiennent qu'à nous, pour votre amour et votre soutien. Merci d'être là, tout simplement.

Enfin, je voudrais remercier **mes parents**, même si de simples remerciements ne seront jamais à la hauteur de ma reconnaissance. Vous avez toujours été là pour nous à chaque moment de notre vie. Vous nous avez offert les meilleures conditions nécessaires à la réalisation de nos parcours respectifs et vous avez toujours tout fait pour nous donner les moyens d'y arriver. Votre soutien et vos encouragements ont été la clé de la réussite de mes études. Comment vous exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude ? Enfin, merci de nous avoir offert une famille si soudée dans les moments difficiles et si complice dans les moments de joie et de partage. Merci pour cet d'amour.

Je voudrais remercier et dédier ce travail à **mon grand père**. Tu as toujours été un modèle pour moi. J'espère avoir hérité de ta soif de connaissances et j'aspire à égaler un jour la richesse de ta culture tout en conservant toute l'humilité qui te caractérise. Merci pour toute cette tendresse et pour tout ce que tu m'as appris. Merci de ces moments de partage sur tant de domaines que nous avons en commun, la montagne, la musique ou la santé. Je ne sais pas si tu liras ces mots ou même si tu pourras les entendre mais je suis sûre que ces sentiments si particuliers qui nous lient n'ont pas besoin d'être exprimés car nous les avons partagés toutes ces années.

Ben. La personne à qui je dois le plus dans la réalisation de ce travail c'est bien toi. Malgré la distance, malgré tes responsabilités et la dureté de ton travail, tu as toujours été à l'écoute, patient et compréhensif. Tu as continué à croire en moi quand ce n'était plus mon cas et tu m'as soutenue jusqu'au bout. Il n'y a pas si longtemps tu m'as d'ailleurs écrit « C'est un peu comme le sport et la randonnée en montagne mais je commence à bien te connaître et je savais très bien que tu arriverais jusqu'au bout malgré les nombreuses embuscades... ». Mais tu vois, la montagne n'est jamais aussi belle que lorsque je la partage avec toi. Enfin, merci encore pour tous ces moments de bonheur, tout ce que tu m'as apporté et tout ce que tu m'as fait découvrir. Tu m'as bonifiée !

Remerciements

Sommaire

Abréviations	1
Liste des figures	5
Préambule.....	7
Rappels bibliographiques.....	9
<i>I Les ganglions de la base</i>	<i>9</i>
<i>I.1. Organisation et fonctions générales des ganglions de la base</i>	<i>9</i>
<i>I.2. Noyaux et connectivités des ganglions de la base</i>	<i>11</i>
I.2.1. Le striatum.....	11
I.2.2. Le globus pallidus	14
I.2.3. Le noyau sous-thalamique.....	14
<i>I.2.3.a : Anatomie du NST et positionnement au sein du réseau des GB.....</i>	<i>15</i>
<i>I.2.3.b : Caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques des neurones du NST. 17</i>	<i>17</i>
<i>I.2.3.c : Physiologie de la voie subthalamo-nigrale.....</i>	<i>19</i>
I.2.4. La substance noire compacte	21
<i>II La Substance Noire Réticulée</i>	<i>23</i>
<i>II.1. Organisation et connectivité.....</i>	<i>23</i>
II.1.1. La SNr : porte de sortie des ganglions de la base	23
II.1.2. Organisation anatomo-fonctionnelle de la SNr	24
<i>II.2. Physiologie des neurones nigraux</i>	<i>26</i>
II.2.1. Caractéristiques morphologiques.....	26
II.2.2. Caractéristiques électrophysiologiques	26
<i>II.3. Afférences de la SNr : régulation de l'activité neuronale par les neurotransmetteurs et neuromodulateurs.....</i>	<i>30</i>
II.3.1. Le GABA	30
II.3.2. Le glutamate	32
II.3.3. La dopamine	34
II.3.4. L'adénosine	35
II.3.5. Les endocannabinoïdes.....	38
II.3.6. La sérotonine	40

II.3.7. L'acétylcholine	40
II.3.8. L'histamine	41
II.3.9. La glycine et la taurine	41
III Dysfonctionnement du réseau des ganglions de la base : cas de la maladie de Parkinson	43
III.1. La maladie de Parkinson	43
III.1.1. Généralités	43
III.1.2. Conséquences sur le fonctionnement du réseau des GB	44
III.1.3. Conséquences sur le fonctionnement de la substance noire réticulée	47
III.2. Thérapie de la maladie de Parkinson par stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique	48
III.2.1. Généralités sur les différentes thérapeutiques de la maladie de Parkinson.....	48
III.2.2. Mécanismes cellulaires à l'origine de l'efficacité de la stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique	49
III.2.2.a : Mécanismes locaux de la SHF du NST : effets sur les neurones du NST.	49
III.2.2.b : Impact de la SHF du NST sur l'activité de la SNr.	51
IV Les astrocytes	54
IV.1. Les cellules gliales	54
IV.1.1. Présentation générale	54
IV.1.2 Les différentes classes de cellules gliales.....	55
IV.1.2. a : Les oligodendrocytes.	55
IV.1.2. b : La microglie.	55
IV.1.2. c : Les cellules NG2.....	56
IV.2. Physiologie et fonctions générales des astrocytes	57
IV.2.1. Caractéristiques membranaires et électrophysiologiques des astrocytes	57
IV.2.2. Organisation spatiale.....	58
IV.2.2. a : Organisation en syncytium.	59
IV.2.2. b : Organisation en « îlots synaptiques fonctionnels».....	60
IV.2.3 Le calcium : élément clé de l'excitabilité astrocytaire.....	62
IV.2.2. a: Les acteurs de la signalisation calcique.	62
IV.2.2. b: Codage spatio-temporel de la signalisation calcique astrocytaire.	63
IV.2.2. c: Activités calciques spontanées.	65
IV.2.4. Diversité des fonctions astrocytaires chez l'adulte.....	66

IV.2.4. a: Maintien du métabolisme énergétique et de l'homéostasie ionique.	66
IV.2.4. b: Recapture des neurotransmetteurs	68
IV.2.4.c : Libération de gliotransmetteurs.	69
IV.3. La synapse tripartite	71
IV.3.1. Recouvrement astrocytaire : un phénomène dynamique.....	72
IV.3.2. Gliotransmission et régulation de l'activité neuronale.....	73
IV.4. Astrocytes et maladie de Parkinson	76
IV.4.1. Astrocytes et pathologies : généralités	76
IV.4.2. Astrocytes et maladie de Parkinson	76
Objectifs	79
Matériel et méthodes	81
<i>I Etude de l'excitabilité calcique des astrocytes par imagerie calcique confocale</i>	81
<i>I.1. Modèle expérimental</i>	81
I.1.1. Modèle animal	81
I.1.2. Réalisation des tranches parasagittales de cerveau de rat	81
I.1.3. Vérification de l'intégrité des connexions pallido-nigrales et subthalamo-nigrales dans notre modèle expérimental.....	82
I.1.4. Marquages immunohistochimiques des différentes populations cellulaires de la SNr....	83
<i>I.2. Imagerie calcique</i>	84
I.2.1.Principe	84
I.2.2. Protocole de chargement avec la sonde calcique	85
I.2.3. Estimation des différents types de populations cellulaires chargées par le Fluo-4 AM ..	85
<i>I.3. Dispositif expérimental</i>	86
I.3.1. Principe et description du dispositif	86
I.3.2. Application d'agents pharmacologiques	87
I.3.3. Stimulation électrique du noyau sous-thalamique	88
<i>I.4. Analyse</i>	88
<i>II Etude de l'activité neuronale par la technique du patch-clamp</i>	90
<i>II.1. Modèle expérimental</i>	90
II.1.1. Modèle animal et réalisation des tranches parasagittales	90
<i>II.2. Patch-clamp</i>	90
II.2.1. Principe.....	90
II.2.2 Dispositif expérimental.....	91

II.2.3. Acquisition	92
II.2.4. Identification cellulaire	93
II.2.5. Enregistrement de l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr.....	93
II.3. Modification de l'activité astrocytaire : application d'agents pharmacologiques et chélation des mouvements calciques	93
II.3.1. Inhibition de l'activité de recapture astrocytaire	93
II.3.2. Diffusion du BAPTA dans le réseau astrocytaire	94
II.3.3. Marquage de la biocytine et quantification	94
II.3.4. Etude de l'implication des récepteurs des eCB et de l'adénosine.....	95
II.4. Analyse	95
Résultats.....	97
<i>I La stimulation électrique du noyau sous-thalamique module l'activité calcique des astrocytes de la SNr</i>	<i>97</i>
<i>I.1. Introduction</i>	<i>97</i>
<i>I.2. Article scientifique</i>	<i>98</i>
<i>I.3. Discussion</i>	<i>113</i>
I.3.1. Considérations méthodologiques	113
I.3.2. Activités calciques des astrocytes de la SNr	114
I.3.3. Expression des récepteurs du glutamate et du GABA par les astrocytes de la SNr.....	115
I.3.4. Réactivité des astrocytes suite à la SHF du NST	115
I.3.5. Conclusion.....	117
<i>II Les astrocytes de la SNr régulent l'activité neuronale spontanée nigrale.</i>	<i>118</i>
<i>II.1. Introduction</i>	<i>118</i>
<i>II.2. Résultats</i>	<i>119</i>
II.2.1. Caractérisation électrophysiologique des neurones et des astrocytes de la SNr.....	119
II.2.2. Impact de la recapture du glutamate et du GABA sur l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr	121
II.2.3. Modulation de l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr par des phénomènes dépendants de l'activité calcique astrocytaire.....	124
II.2.4. Régulation de l'activité de décharge spontanée neuronale par l'adénosine	127
<i>II.3. Discussion.....</i>	<i>131</i>
II.3.1 Considérations méthodologiques.....	131
II.3.2 Impact de l'activité de recapture astrocytaire sur l'activité neuronale de la SNr	134

II.3.3 Impact de l'excitabilité calcique astrocytaire sur l'activité neuronale de la SNr	136
II.3.4 Hypothèse de la gliotransmission	137
II.3.5 Conclusion	139
Discussion générale et perspectives	141
<i>I Aspect bidirectionnel de la communication entre les neurones et les astrocytes de la SNr.....</i>	<i>142</i>
<i>I.1. Les astrocytes de la SNr et la balance glutamate/GABA : spectateurs ou acteurs ?</i>	<i>142</i>
<i>I.2. Astrocytes et neurones de la SNr : un ménage à trois complexe.....</i>	<i>144</i>
<i>II Les astrocytes sont-ils impliqués dans la dérégulation de l'activité neuronale de la SNr ?</i>	<i>149</i>
Bibliographie.....	153

Abréviations

2-AG	2-arachidonoylglycerol
5-HT	5-hydroxy-tryptamine
6-OHDA	6-hydroxydopamine
ACh	acétylcholine
ACSF	artificial cerebro-spinal fluid
ADPRc	adenosine di-phosphate ribose cyclique
AEA	anadamide
AHP	after hyperpolarisation
AM	acetoxymethyl ester
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionate
AP _{amp}	action potential amplitude
AP _{dur}	action potential duration
AP _{th}	action potential threshold
ATP	adénosine tri-phosphate
ATV	aire tegmentale ventrale
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BGS	basal ganglia slice
Ca _v	canaux calciques dépendants du voltage
CICR	Ca ²⁺ induced Ca ²⁺ release
Cx	connexine
CB	cannabinoid
DHK	dihydrokainic acid
DMSO	diméthylsulfoxyde
DSE	depolarisation-induced suppression of excitation
DSI	depolarization-induced suppression of inhibition
EAAT	excitatory amino acid transporter
eCB	endocannabinoid

EP	entopedoncular nucleus
EPSC	excitatory post-synaptic current
FR	firing rate
GABA	acide γ -aminobutyrique
GAT	GABA transporter
GB	ganglions de la base
GDNF	glial-derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acid protein
GLAST	glutamate aspartate transporter
GLT-1	glutamate transporter-1
GLUT	glucose transporter
GPe	globus pallidus externe
GPI	globus pallidus interne
HCN	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels
I_{NaT}	transient sodium current
I_{CAN}	nonspecific cationic current
IPSC	inibitory post-synaptic current
IP_3	inositol tri-phosphate
I_{NaP}	persistant sodium current
Kv	canaux potassiques dépendants du voltage
L-DOPA	L-dihydroxyphenylalanine
LTD	long term depression
LTP	long term potentiation
NA	nipecotic acid
nACh	récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NGS	normal serum goat
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
mACh	récepteur muscarinique de l'acétylcholine
MANF	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
mGluR	récepteur glutamatergique métabotropique

MP	maladie de Parkinson
MPTP :	1-methyle 4- phényl 1,2,3,6-tetrahydro pyridine
MSN	medium spiny neuron
NST	noyau sous-thalamique
Na _v	canaux sodiques dépendants du voltage
OPC	oligodendrocyte precursor cell
PFA	paraformaldéhyde
P ₂ X	récepteur purinergique ionotropique
P ₂ Y	récepteur purinergique métabotrope
PLC	phospholipase C
PPN	pedunculopontin nucleus
RE	reticulum endoplasmique
Ri	input resistance
RyR	ryanodine receptor
SERCA	sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPases
SNAP 25	synaptosome-associated protein 25
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor associated protein receptor
SNC	système nerveux central
SNe	substance noire compacte
SNl	substance noire latérale
SNr	substance noire réticulée
SHF	stimulation à haute fréquence
SK _{Ca}	small-conductance calcium-dependent potassium channel
SR101	sulforhodamine 101
TRP	transient receptor potential
TTX	tetrodotoxine
VAMP2	vesicle-associated protein 2
VGLUT	vesicular glutamate transporter
V _m	potentiel membranaire de repos
VNUT	vesicular nucleotide transporter

Liste des figures

- Figure 1 : Schéma des différents circuits cortico-GB-thalamo-corticaux chez le primate et représentation des différents noyaux des GB.
- Figure 2 : Oscillations membranaires d'un neurone épineux du striatum (MSN) et lecture des informations corticales chez le rat.
- Figure 3 : Représentation schématique des différents territoires fonctionnels du NST chez le rat et le primate.
- Figure 4 : Représentation schématique des différentes afférences du NST et de leurs contacts synaptiques chez le rat et le primate.
- Figure 5 : Mécanismes ioniques impliqués dans les oscillations membranaires responsables de l'émission de bouffées de potentiel d'action par les neurones du NST.
- Figure 6 : Différents types de réponse synaptique des neurones de la SNr suite à une stimulation électrique unique du NST réalisée en tranche chez le rat en fonction du plan de coupe.
- Figure 7 : L'organisation de la substance noire réticulée présente une géométrie particulière dite en pelures d'oignon.
- Figure 8 : Les neurones GABAergiques et dopaminergiques de la SNr présentent différentes caractéristiques électrophysiologiques.
- Figure 9 : Les neurones GABAergiques de la SNr sont spontanément dépolarisés par deux types de courants sodiques.
- Figure 10 : Les afférences striato-nigrales et pallido-nigrales régulent l'activité des neurones de la SNr.
- Figure 11 : La dopamine régule l'activité neuronale nigrale à différents niveaux.
- Figure 12 : Schéma de la régulation de la transmission synaptique par l'adénosine *via* les récepteurs de type A₁ et A_{2A}.
- Figure 13 : La plasticité des synapses striato-nigrales induite par les eCB ou par la dopamine dépend de l'activation des récepteurs NMDA.
- Figure 14 : La maladie de Parkinson se caractérise par une perturbation de l'activité du réseau des ganglions de la base.
- Figure 15 : La lecture des informations corticales par les MSNs est perturbée lors d'une lésion nigro-striatale.
- Figure 16 : La puissance et la cohérence des activités neuronales dans la bande de fréquence bêta dans le cortex et le NST sont augmentées en condition d'hypodopaminergie.
- Figure 17 : Le blocage des récepteurs dopaminergiques modifie le patron de décharge des neurones de la SNr.
- Figure 18 : La stimulation à haute fréquence du NST réduit les oscillations dans la bande de fréquence bêta.
- Figure 19 : La stimulation à haute fréquence du NST induit une excitation ou une inhibition des neurones de la SNr.
- Figure 20 : Les cellules gliales dessinées par Santiago Ramon y Cajal.
- Figure 21 : Les cellules NG2 et les oligodendrocytes partagent les mêmes étapes de différenciation.

- Figure 22 : Organisation spatiale des astrocytes.
- Figure 23 : Les astrocytes sont organisés en territoires fonctionnels *in vivo*.
- Figure 24 : Représentation schématique des principales voies de la signalisation calcique au niveau des astrocytes.
- Figure 25: Les astrocytes sont un soutien énergétique pour les neurones.
- Figure 26 : Les astrocytes sont impliqués dans le couplage métabolique et participent à l'extrusion du glutamate de la fente synaptique.
- Figure 27 : Les astrocytes peuvent libérer des gliotransmetteurs par des mécanismes vésiculaires ou non vésiculaires.
- Figure 28: Les prolongements astrocytaires sont le troisième constituant de la synapse tripartite.
- Figure 29 : La gliotransmission module la transmission synaptique de différentes façons.
- Figure 30: Le recouvrement synaptique astrocytaire est augmenté dans le striatum chez le singe traité au MPTP.
- Figure 31 : Coupe parasagittale de cerveau de rat contenant les structures d'intérêt.
- Figure 32 : Principe de la microscopie confocale à fluorescence.
- Figure 35 : Schéma du principe et des différentes configurations du patch-clamp.
- Figure 36: Réponse électrophysiologique des neurones et des astrocytes de la SNr suite à l'injection de courants ou de voltages hyperpolarisants puis dépolarisants.
- Figure 37 : Impact de la recapture astrocytaire du glutamate ou de la recapture du GABA sur l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr.
- Figure 38: Impact du blocage des activités calciques d'un réseau astrocytaire sur l'activité de décharge spontanée d'un neurone GABAergique de la SNr.
- Figure 39 : Evaluation de différents paramètres du réseau astrocytaire au sein de la SNr par diffusion de biocytine.
- Figure 40: Impact de l'application d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'adénosine ou des endocannabinoïdes sur la fréquence de décharge spontanée des neurones GABAergiques de la SNr.
- Figure 41: Hypothèses des conséquences d'une gliotransmission d'ATP dans la SNr.
- Table 1 : Anticorps primaires utilisés pour l'identification des populations cellulaires de la SNr.
- Table 2 : Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés dans les études de l'excitabilité calcique astrocytaire.
- Table 3 : Récapitulatif des inhibiteurs de la recapture glutamatergique et GABAergique utilisés.
- Table 4 : Récapitulatif des différents antagonistes des récepteurs utilisés en électrophysiologie
- Table 5 : Caractéristiques électrophysiologiques des neurones et des astrocytes de la SNr.
- Table 6: Effet de la diffusion du BAPTA dans le réseau astrocytaire sur les paramètres électrophysiologiques des neurones GABAergiques de la SNr.

Préambule

Les ganglions de la base (GB) sont un ensemble de noyaux sous-corticaux interconnectés, impliqués dans la mise en place de programmes cognitivo-moteurs et dans des processus d'apprentissage procédural. Parmi les différents noyaux qui composent les GB, la substance noire réticulée (SNr) est la structure qui sera au centre de ce travail. En tant que structure de sortie des GB, la SNr intègre l'ensemble des différentes informations en provenance des autres noyaux des GB puis les transmet au cortex *via* un relais thalamique (Deniau et al., 2007). Plus précisément, la SNr exerce une inhibition constante de ses cibles en raison de son activité « pace-maker » et de la nature principalement GABAergique de ses neurones. Ainsi, la transmission des informations des GB au cortex requiert une régulation fine de l'activité neuronale de cette structure de sortie, permettant de renforcer ou de lever l'inhibition exercée par celle-ci. Hormis certains mécanismes intrinsèques, la régulation de l'activité neuronale de la SNr repose principalement sur une balance entre les libérations de glutamate et de GABA. Ces neurotransmetteurs proviennent des principales structures afférentes que sont le noyau sous-thalamique (NST), le striatum et le globus pallidus externe (GPe). L'ensemble des acteurs impliqués dans la régulation de l'activité neuronale de la structure de sortie des GB est relativement bien documenté mais paradoxalement, aucune étude ne fait état du rôle des cellules gliales dans cette modulation. Pourtant, depuis la proposition du modèle de la synapse tripartite (Araque et al., 1999), il est largement admis que les astrocytes exercent un rôle modulateur de la communication neuronale. Dans ce modèle, les astrocytes sont capables de détecter l'activité neuronale et d'agir en retour sur la transmission synaptique de différentes manières.

La première partie de ce manuscrit consistera en des rappels bibliographiques scindés en quatre chapitres. Dans un premier temps, nous nous intéresserons au réseau des GB. Nous exposerons brièvement les fonctions de ce réseau ainsi que les différentes voies qui le composent. Nous décrirons les différents noyaux des GB en nous focalisant tout particulièrement sur l'une des structures afférentes de la SNr qui est le noyau sous-thalamique, ainsi que sur les relations particulières entre NST et SNr. Les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de la SNr seront abordées dans un second chapitre. Par la suite, nous verrons que des dysfonctionnements du réseau des GB peuvent mener à certaines pathologies et nous nous intéresserons plus particulièrement à la maladie de Parkinson. Dans ce troisième chapitre, nous décrirons la physiopathologie de l'ensemble des GB en nous focalisant sur les modifications de l'activité neuronale au niveau de la SNr. Enfin, nous parlerons des thérapeutiques de cette pathologie en nous concentrant sur une approche

neurochirurgicale : la stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique. Nous traiterons des mécanismes qui sous-tendent les effets bénéfiques de cette thérapeutique au niveau du noyau sous-thalamique lui-même et nous nous intéresserons également à l'impact de cette stimulation sur l'activité neuronale de la SNr. Le quatrième et dernier chapitre sera consacré aux astrocytes. Nous évoquerons les différents types de cellules gliales et nous décrirons de manière exhaustive la physiologie des astrocytes. Nous verrons que ces cellules possèdent des propriétés membranaires spécifiques. Nous discuterons de l'excitabilité calcique des astrocytes et de leurs différentes fonctions en nous focalisant sur la synapse tripartite. Enfin, nous discuterons de l'implication des astrocytes dans les pathologies et notamment dans la maladie de Parkinson.

La deuxième partie de ce manuscrit détaillera le modèle et les différentes méthodes utilisés dans ce travail, à savoir l'imagerie calcique confocale et le patch-clamp appliqués en tranches parasagittales de cerveau de rat.

Dans une troisième partie, je présenterai les différents résultats obtenus. Le premier volet de ces résultats sera présenté sous forme d'un article scientifique accompagné d'une introduction et d'une discussion. Cette première partie des résultats concernera l'activité calcique des astrocytes de la SNr et la sensibilité de ces cellules à leur environnement neuronal. La seconde partie des résultats sera rédigée de manière plus classique et concernera un autre versant de la communication neurone-astrocyte puisqu'elle traitera de la régulation de l'activité des neurones de la SNr par certaines fonctions astrocytaires.

Nous terminerons avec la dernière partie qui consistera en une discussion générale. Nous y résumerons les principaux résultats et tenterons de dégager les perspectives pouvant faire suite à ce travail.

Rappels bibliographiques

I Les ganglions de la base

I.1. Organisation et fonctions générales des ganglions de la base

Les ganglions de la base (GB) sont un ensemble de noyaux sous-corticaux organisés en circuits parallèles, qui interagissent entre eux ainsi qu'avec de nombreuses autres structures cérébrales (Albin et al., 1989). Les GB ont tout d'abord été décrits comme intervenant dans l'initiation du mouvement et la sélection de l'action (Percheron et al., 1994). Les rôles des GB se sont depuis élargis à des composantes plus associatives et limbiques. En effet, la genèse d'un comportement moteur implique l'orchestration de fonctions non seulement motrices mais également cognitives et limbiques. Ainsi, les GB sont impliqués dans la préparation, l'initiation et la sélection de l'action, en intégrant les informations sensori-motrices, associatives et limbiques de l'environnement, afin de sélectionner, agencer et organiser le schéma comportemental le plus approprié (Brown and Pluck, 2000). De plus, lors d'actions répétées, les GB participent à la mise en place de la mémorisation des séquences motrices (Chakravarthy et al., 2010). En résumé, les GB participent non seulement à la planification et à la réalisation du mouvement, mais interviennent également dans l'ensemble des processus cognitifs, motivationnels et émotionnels qui s'y rattachent (Middleton and Strick, 2000).

Les GB sont organisés en réseau et traitent les informations en provenance de toutes les aires corticales. Une fois traitées, ces informations sont à nouveau transmises au cortex, *via* un relais thalamique. Afin de conserver la somatotopie corticale, les GB sont organisés de façon particulière. En effet, les informations provenant des différentes aires corticales sont réparties en voies parallèles, le long du réseau des GB. Ainsi, on peut définir cinq circuits fonctionnels cortico-GB-thalamo-corticaux : moteur, oculomoteur, dorsolatéral préfrontal, orbito-frontal latéral et limbique (figure 1) (Alexander and Crutcher, 1990). Cependant, ces canaux parallèles de l'information ne sont pas exclusifs et nous verrons qu'ils communiquent entre eux à différents niveaux.

Les aires corticales se projettent directement sur les deux structures d'entrée des GB que sont le striatum et le noyau sous-thalamique (NST). Les informations sont ensuite transmises jusqu'aux structures de sortie : la substance noire réticulée (SNr) et le globus pallidus interne (GPi) chez le

primate, ou noyau entopédonculaire (EP) chez le rat (Alexander and Crutcher, 1990). Cette transmission des informations peut alors se faire selon trois voies distinctes : directe, indirecte et hyperdirecte (figure 1). Les voies directe et hyperdirecte utilisent respectivement le striatum et le NST comme structures d'entrée, puis se projettent directement vers les structures de sortie (SNr et GPi/EP). La voie indirecte utilise également le striatum comme structure d'entrée mais établit des relais au niveau du globus pallidus externe (GPe), puis du NST avant de rejoindre les structures de sortie (Alexander and Crutcher, 1990; DeLong, 1990). En parallèle, la substance noire compacte (SNc) exerce une régulation fine et précise du fonctionnement de ces différents noyaux puisqu'elle constitue, avec l'aire tegmentale ventrale (ATV), la principale source de dopamine du réseau (figure 1).

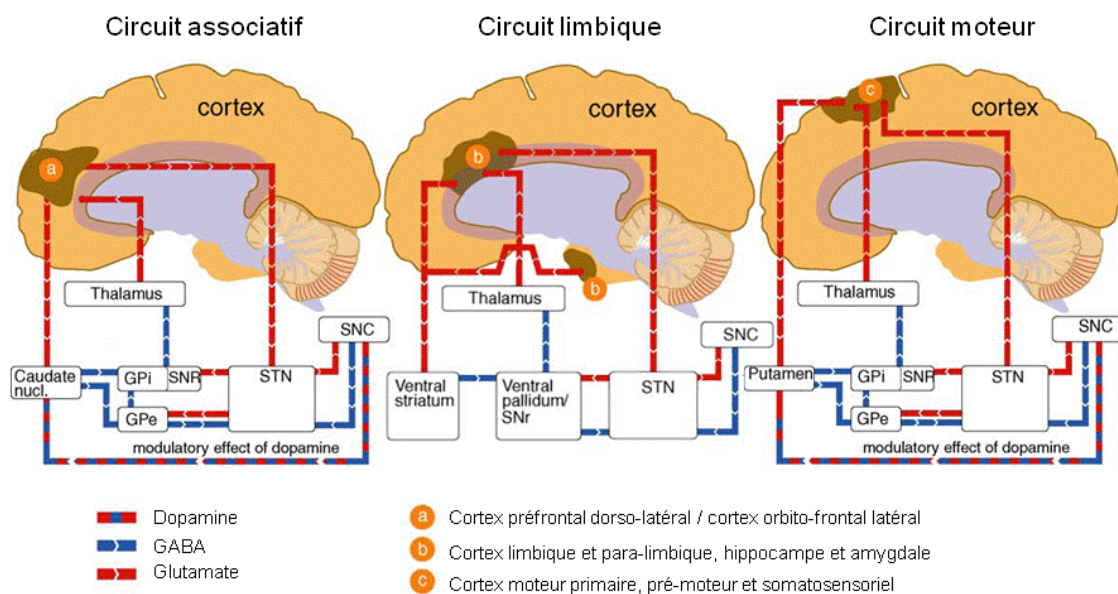


Figure 1 : Schéma des différents circuits cortico-GB-thalamo-corticaux chez le primate et représentation des différents noyaux des GB. Chacune des différentes aires corticales projette vers le striatum et le noyau sous-thalamique (NST). La voie directe relie le striatum au globus pallidus interne (GPi) et à la substance noire réticulée (SNr). La voie indirecte relie le striatum au globus pallidus externe (GPe) puis au NST avant d'atteindre le GPi et la SNr. Enfin, la voie hyper-directe relie directement le NST aux structures de sortie GPi et SNr. La substance noire compacte est la structure dopaminergique des circuits associatif et moteur des GB. L'aire tegmentale ventrale (non représentée ici) est la structure dopaminergique du circuit limbique des GB. D'après Temel et al., 2005.

La mise en jeu des voies directe, indirecte et hyperdirecte est à l'origine d'effets opposés sur l'activité des neurones de sortie des GB et, par conséquent, sur les cibles thalamiques (Maurice et al., 1999). Ainsi, le cortex cérébral peut être à l'origine d'une activation ou d'une inhibition du thalamus selon le type de voie emprunté (trans-striatales ou trans-subthalamiques). Cependant, il faut garder à l'esprit qu'il existe également des voies parallèles qui permettent de réguler les voies principales et de créer des interactions entre elles. Parmi ces voies, citons par exemple les

afférences du GPe vers la SNr ou du NST vers le GPe mises en évidence chez le rat (Smith and Bolam, 1991; Magill et al., 2000).

Dans cette partie, je me propose de décrire succinctement les différents noyaux des GB ainsi que leurs interactions. Je m'attarderai d'avantage sur le NST et la voie subthalamo-nigrale étant donné qu'elle constitue l'un des supports de mon projet de recherche. La substance noire réticulée étant au centre de mon travail, fera l'objet d'un chapitre à part.

1.2. Noyaux et connectivités des ganglions de la base

1.2.1. Le striatum

Le striatum constitue, avec le NST, l'une des structures d'entrée des GB. Il se subdivise en une partie dorsale et une partie ventrale, chacune impliquée dans différentes boucles fonctionnelles. Le striatum ventral, aussi appelé noyau accumbens, est surtout impliqué dans les fonctions limbiques et associatives des GB (Voorn et al., 2004). Chez le primate, le striatum dorsal comprend le noyau caudé et le putamen, séparés par la capsule interne. Chez le rongeur, l'absence de capsule interne ne permet pas de délimiter ces deux compartiments. Le striatum dorsal est essentiellement impliqué dans des fonctions motrices et associatives (Heimer, 1995; Voorn et al., 2004).

En tant que structure d'entrée des GB, le striatum a la capacité de détecter les informations corticales pertinentes et de les intégrer. Hormis du cortex, le striatum reçoit entre autre des afférences provenant du NST (Parent and Hazrati, 1995b), de la SNc (Faull and Carman, 1968; Haber et al., 2000) et du thalamus (Deschenes et al., 1995; McFarland and Haber, 2000) qui ont été mises en évidence chez le rat et le primate. Concernant les afférences corticales, le striatum reçoit des informations de l'ensemble du cortex cérébral (McGeorge and Faull, 1989). Comme nous l'avons mentionné précédemment, les projections cortico-striatales s'organisent selon une topographie bien particulière, permettant l'organisation en canaux parallèles de l'information. Ces projections créent alors un gradient depuis la partie dorso-latérale du striatum jusqu'aux zones ventro-médianes. La partie dorso-latérale reçoit des projections provenant des cortex moteur et sensorimoteur, la partie centrale reçoit les informations du cortex associatif et les parties ventro-médianes sont en relation avec le système limbique chez le rat (McGeorge and Faull, 1989; Parent and Hazrati, 1995b) et le primate (Haber, 2003). Il existe cependant un recouvrement de ces différentes voies, responsable d'une certaine convergence de l'information. En effet, les afférences cortico-striatales chez le singe sont organisées en projections denses et diffuses permettant à la fois une convergence et une ségrégation au sein du striatum (Haber et al., 2006b). Enfin, les relations entre les différentes régions (sensori-motrices, associatives et

limbiques) sont permises par des interactions avec les noyaux dopaminergiques de la SNc et de l'ATV (Haber et al., 2000).

Au delà de sa compartimentalisation fonctionnelle, le striatum présente une hétérogénéité du point de vue moléculaire et cellulaire. Les propriétés histochimiques permettent de distinguer deux compartiments au sein du striatum dorsal : la matrice et les striosomes (Graybiel and Ragsdale, 1978; Desban et al., 1993). La matrice occupe la plus grande partie du striatum et exprime l'enzyme de dégradation de l'acétylcholine (l'acétylcholine estérase, AChE). Les striosomes forment un réseau labyrinthique au sein de la matrice et n'expriment pas l'AChE. Ces deux compartiments ne sont pas organisés de façon homogène: la matrice est principalement innervée par les zones motrices et sensorielles et se projette préférentiellement vers le GPi/EP, le GPe et la SNr; à l'inverse, les striosomes sont plutôt la cible des cortex limbique et préfrontal et projettent principalement vers la SNc (Graybiel and Ragsdale, 1978; Gerfen, 1985; Ragsdale and Graybiel, 1990).

D'un point de vue cellulaire, le striatum est principalement constitué de neurones de projections GABAergiques, les « Medium Spiny Neurons » (MSN), que l'on peut classer en deux sous-populations: **1)** les MSNs impliqués dans la voie directe, exprimant les récepteurs dopaminergiques de type D1 (excitateurs) et muscariniques de type M4 (inhibiteurs), la substance P et la dynorphine; **2)** les MSNs appartenant à la voie indirecte, exprimant les récepteurs dopaminergiques de type D2 (inhibiteurs), muscariniques de type M1 (excitateurs) et l'enképhaline (Izzo et al., 1987; Gerfen et al., 1990).

Enfin, le striatum contient des interneurones de natures GABAergique et cholinergique (Kawaguchi, 1993). Les arborisations de ces interneurones s'étendent indifféremment dans les territoires matriciels et striosomaux, permettant de faire un lien entre ces compartiments (Kubota and Kawaguchi, 1993).

En lien avec toutes les aires corticales, les MSNs reçoivent de nombreuses projections neuronales. Grâce à leurs caractéristiques électrophysiologiques, ces neurones sont capables de trier les informations afin d'extraire celles qui sont pertinentes. Le potentiel de membrane des MSNs oscille entre un état très polarisé (qualifié de « down state ») et des rebonds de dépolarisation (« up state ») (l'émission de potentiels d'action n'étant possible que lors des états « up ») (figure 2A). Cependant, les MSNs sont sous le contrôle de différentes sources d'inhibition, limitant ainsi l'émission de potentiels d'action durant les états « up ». Lors d'une excitation par les afférences corticales, les interneurones GABAergiques du striatum sont activés plus rapidement que les MSNs. Ce phénomène entraîne alors une inhibition des MSNs par les interneurones, connue sous le nom d'inhibition « feedforward ». Par ailleurs, les MSNs sont sujets à une inhibition en « feedback » qui résulte d'inhibitions locales exercées par leurs collatérales. Ainsi, l'émission de potentiel d'action n'est possible que lorsque les MSNs sont en état « up » (*i.e.* partiellement dépolarisés) et qu'ils ne pas soumis aux inhibitions décrites ci-

dessus. Ces conditions sont réunies lors de fortes entrées corticales, opérées de façon synchrones (Figure 2B) [pour revue voir (Murer et al., 2002)]. Cependant, il est important de mentionner que les états « up » et « down » dépendent du type d'anesthésie utilisé et que les MSNs peuvent présenter d'autres patrons de décharge (Mahon et al., 2001).

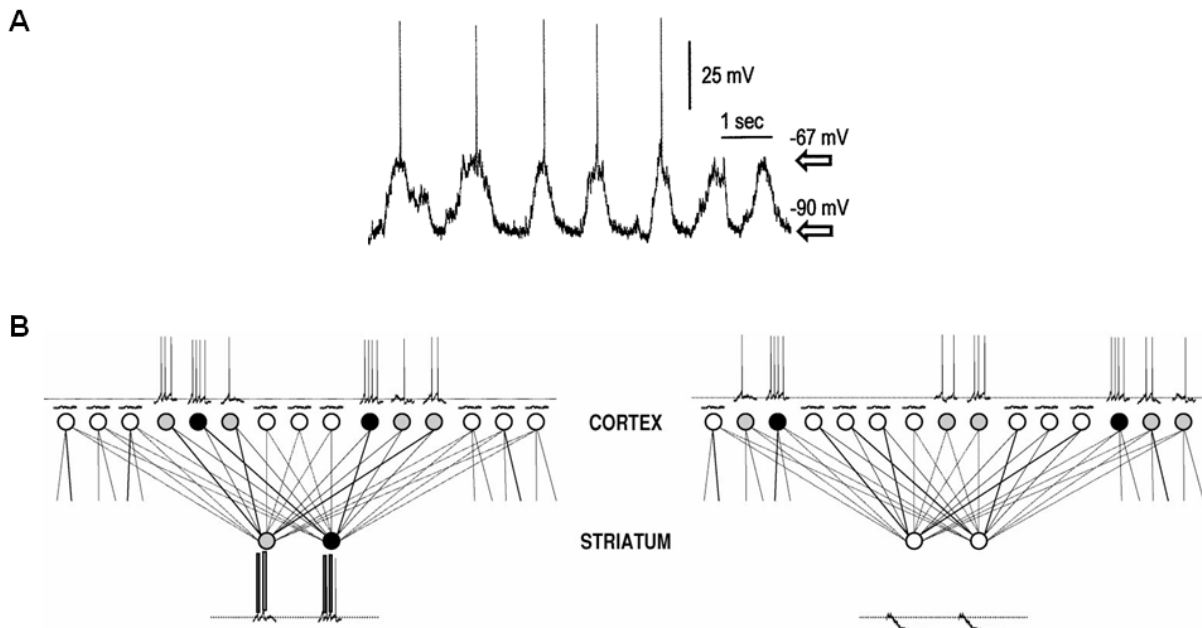


Figure 2 : Oscillations membranaires d'un neurone épineux du striatum (MSN) et lecture des informations corticales chez le rat. A. Oscillations du potentiel de membrane d'un MSN entre un état hyperpolarisé et dépolarisé. B. Comportement des MSNs en fonction des différentes entrées corticales. Les entrées corticales peuvent être de différentes intensités (faibles : ronds blancs, fortes : ronds gris ou très fortes : ronds noirs). L'émission de potentiels d'action par les MSNs ne survient que lors de fortes entrées corticales corrélées (figure de gauche). D'après Murer et al., 2002.

En résumé, les MSNs ne sont activés qu'en réponse à un certain type d'information et sont, de ce fait, considérés comme des détecteurs de coïncidence (Calabresi et al., 1987).

En parallèle, ces neurones sont soumis à une régulation tonique par la dopamine (provenant de la SNc) et l'acétylcholine (provenant des interneurons cholinergiques), ce qui permet une régulation fine et précise de l'activité neuronale de la structure d'entrée des GB (Bar-Gad et al., 2003; Plenz, 2003).

En opposition avec la diversité de ses afférences, le striatum projette sur peu de structures. Il projette sur le GPe, le GPi (ou EP chez le rat) et la SN (majoritairement sur la SNr mais certaines fibres atteignent la SNc). Chacun des trois territoires striataux (sensorimoteur, associatif et

limbique) se projette de façon spécifique, permettant une conservation de la somatotopie et de la ségrégation des informations (Parent and Hazrati, 1995b).

I.2.2. Le globus pallidus

Chez l'homme et le primate, le GP se subdivise en deux parties : le GPe et le GPi. Le rongeur ne possède pas de GPi, son homologue étant le noyau entopédunculaire (EP) (Nambu, 2007). Les segments externe et interne du GP reçoivent les mêmes afférences mais projettent vers différentes structures et ont divers rôles au sein des GB. Les neurones du GPe et du GPi présentent une activité spontanée, régulée par une balance entre le glutamate et le GABA provenant principalement du NST et du striatum. Ces afférences sont elles-mêmes sous le contrôle de la dopamine et de la sérotonine (Jaeger and Kita, 2011).

Le GPe est classiquement considéré comme une structure relais de la voie indirecte des GB. Il reçoit des afférences en provenance du NST et du striatum et projette vers la SNr, le GPi/EP et le thalamus. Cependant, ce noyau ne peut être considéré comme un simple relais mais plutôt comme une structure intégrative capable d'affecter l'ensemble des noyaux des GB, grâce notamment aux interactions réciproques avec le striatum et le NST (Parent and Hazrati, 1995b; Bar-Gad et al., 2003). Les neurones GABAergiques du GPe présentent de nombreuses dendrites qui s'étendent sur de longues distances, ce qui permettrait d'intégrer des informations provenant de multiples régions différentes (Jaeger and Kita, 2011). Ces neurones sont spontanément actifs et présentent différentes caractéristiques. La majorité d'entre eux présente une activité de décharge spontanée à haute fréquence (50 à 70 Hz) entrecoupée de pauses, alors que d'autres ont une activité plus lente, entrecoupée de bouffées de potentiels d'action (DeLong, 1971; Elias et al., 2007). Le rôle de ces pauses n'est pas clairement défini. Une étude réalisée chez le singe a montré que la fréquence et la durée des pauses sont augmentées durant les périodes où l'animal ne réalise pas de tâche comportementale (notamment une tâche motrice dirigée vers un but). Les pauses seraient donc préférentiellement impliquées dans des phénomènes de repos (Elias et al., 2007).

Le GPi (ou EP chez les rongeurs) constitue l'une des deux structures de sortie des GB. Il reçoit des afférences GABAergiques en provenance du striatum et du GPe, glutamatergiques en provenance du NST et dopaminergiques en provenance de la SNc (Smith et al., 1990; Smith and Bolam, 1991). Les neurones du GPi sont également spontanément actifs et possèdent des propriétés similaires à celles du GPe (DeLong, 1971). Ils exercent une inhibition tonique des structures cibles que sont les noyaux thalamiques et le tronc cérébral (Parent et al., 2001).

I.2.3. Le noyau sous-thalamique

Le NST est à la fois une structure d'entrée dans le réseau des GB (*via* la voie hyperdirecte) et un relais dans la voie indirecte.

1.2.3.a : Anatomie du NST et positionnement au sein du réseau des GB.

Le NST, seule structure glutamatergique des GB, est un noyau relativement petit et dense. Les différents territoires fonctionnels moteurs, associatifs et limbiques des GB que nous avons décrits au niveau du striatum, sont également retrouvés au niveau du NST. Chez le primate, le NST se subdivise en trois sous-territoires : somato-moteur (au niveau dorsolatéral), associatif (au niveau ventromédian) et limbique (au niveau médian) (figure 3A). Chez le rongeur, deux grands domaines se distinguent: la partie médiane remplit des fonctions associatives et limbiques alors que la partie latérale est en lien avec des fonctions sensori-motrices (figure 3B) (Temel et al., 2005; Tan et al., 2006).

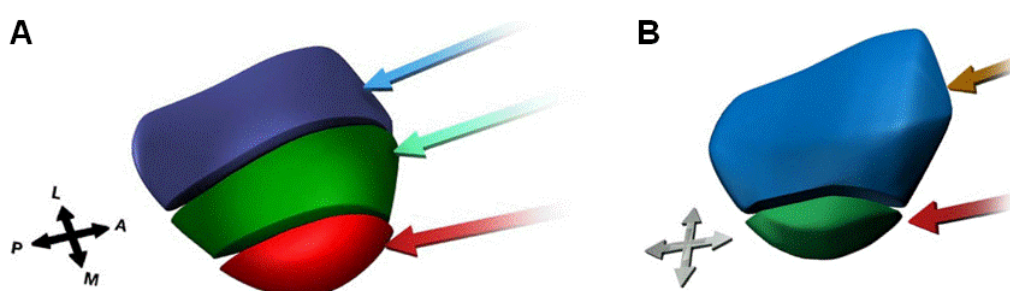


Figure 3 : Représentation schématique des différents territoires fonctionnels du NST chez le rat et le primate. A. Chez le primate, le NST se divise en trois territoires : somato-moteur (bleu), associatif (vert) et limbique (rouge). B. Chez le rat deux subdivisions sont définies : somato-moteur (bleu), associatif et limbique (vert). D'après Temel et al., 2005 (A) et d'après Tan et al., 2006 (B).

Le NST reçoit de nombreuses afférences, illustrées dans la figure 4. Les afférences corticales proviennent majoritairement du cortex moteur primaire chez le primate et du cortex préfrontal, moteur primaire et somato-sensoriel chez le rongeur (Parent and Hazrati, 1995a). Les afférences glutamatergiques proviennent également du noyau pédonculopontin (PPN) et des noyaux centro-médian et parafasciculaire du thalamus, chez le rat comme chez le primate (les projections du noyau parafasciculaire étant majoritaires chez le primate). Ces afférences effectuent des contacts synaptiques au niveau dendritique des neurones du NST (Kitai and Deniau, 1981; Afsharpour, 1985; Parent and Hazrati, 1995a; Hamani et al., 2004). Les afférences GABAergiques proviennent quant à elles du GPe et établissent des contacts au niveau dendritique et somatique et ce chez le rat comme chez le primate (Parent and Hazrati, 1995a; Bevan et al., 2002b; Hamani et al., 2004). La SNc contacte également le NST et libère de la dopamine au niveau du cou des épines dendritiques (Brown et al., 1979; Parent and Hazrati, 1995a; Hamani et al., 2004). Cette innervation est plus importante chez le rat que chez le primate (Parent and Hazrati, 1995a). Enfin, chez le rat comme chez le primate, le NST est sous le contrôle de l'acétylcholine et de la

sérotonine en provenance du PPN et du noyau du raphé respectivement (Parent and Hazrati, 1995a; Hamani et al., 2004).

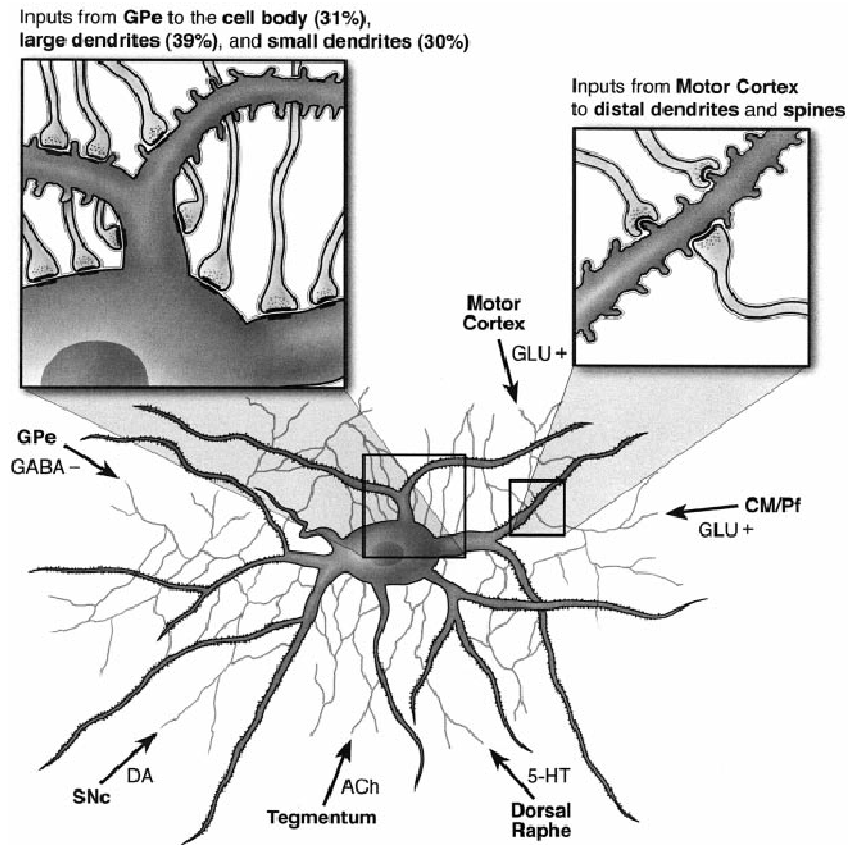


Figure 4 : Représentation schématique des différentes afférences du NST et de leurs contacts synaptiques chez le rat et le primate. Les afférences excitatrices et modulatrices en provenance du cortex, du thalamus, de la substance noire compacte (SNe), du noyau du raphé et du tegmentum établissent des synapses au niveau des dendrites distales. Les afférences GABAergiques du globus pallidus externe (GPe) établissent des synapses sur les dendrites distales et proximales, ainsi que sur les somas. D'après Hamani et al., 2004.

En retour, le NST projette en direction du GPe et du GPi chez le primate, ou du GPe et de l'EP chez le rongeur. Il projette également vers le striatum où il supplée à l'action excitatrice du cortex et du thalamus (Parent and Hazrati, 1995a). Enfin, le NST projette en direction des deux parties de la substance noire : la SNe et la SNr chez le rat et le primate. Les interactions du NST avec les autres noyaux sont souvent complexes et se répercutent sur l'ensemble du réseau des GB. Les relations avec le GPe sont, par exemple, à l'origine d'interactions récurrentes pouvant aboutir à des oscillations synchrones, jouant le rôle de « pace-maker » central des GB (Plenz et al., 1998).

1.2.3.b : Caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques des neurones du NST.

Les somas des neurones du NST présentent une forme ovoïde d'où partent 2 à 8 dendrites primaires, et l'arbre dendritique est orienté parallèlement à l'axe rostro-caudal. Chez le rat, l'arborisation dendritique s'étend dans tout le noyau voire au-delà, alors qu'elle semble être plus restreinte chez le primate (Hammond and Yelnik, 1983; Temel et al., 2005).

D'un point de vue électrophysiologique, ces neurones sont dotés d'une activité spontanée (autour de 13 ± 18 Hz chez le rat et de 18 ± 25 Hz chez le primate) (Hamani et al., 2004). Cette activité se divise classiquement en différents phases: une phase de dépolarisation qui permet d'atteindre le seuil d'émission du potentiel d'action, le potentiel d'action, puis une phase d'hyperpolarisation post-potentiel d'action (AHP). Ces différentes phases sont retrouvées au niveau de toutes les structures des GB dotées d'une activité « pace-maker » (*i.e.* NST, GPe, SNc, SNr, GPi/EP). Concernant le NST, la phase de dépolarisation initiale est sous-tendue par un courant sodique persistant, le I_{NaP} (Bevan and Wilson, 1999; Beurrier et al., 2000). Ce I_{NaP} (pour « Sodium Persistent Current ») est un courant sodique qui ne s'inactive pas et qui présente un seuil d'activation plus négatif que celui du courant sodique responsable de la phase de dépolarisation du potentiel d'action (Crill, 1996). La phase d'AHP, quant à elle, est dépendante du calcium. Plus précisément, l'entrée de calcium résulte de l'activation des canaux calciques à haut seuil (les $Ca_v2.2$) durant la phase de dépolarisation du potentiel d'action. Le calcium est alors responsable de l'activation de canaux potassiques: les SK_{Ca} (pour « small-conductance calcium-dependent potassium channel »). Le courant sortant ainsi produit permet d'hyperpolariser la membrane et génère la phase d'AHP. Cette phase est un paramètre important dans la régulation de la fréquence de décharge des neurones (Bevan and Wilson, 1999; Hallworth et al., 2003).

Parmi les neurones du NST spontanément actifs, certains présentent la capacité de passer d'un mode de décharge régulier appelé « single spike » à un mode de décharge en « burst » (Beurrier et al., 1999). Cette capacité des neurones à émettre des potentiels d'action en bouffées se retrouve également *in vivo* et corrèle avec la réalisation d'un mouvement (Wichmann et al., 1994). Le passage du mode « single spike » au mode « burst » résulte d'oscillations du potentiel de membrane, faisant appel à l'activation de différents canaux ioniques (figure 5). Tout d'abord, l'activation de canaux calciques à bas seuil (de type T/R), engendre un courant calcique ($I_{T/R}$) qui dépolarise la membrane. Cette dépolarisation permet d'activer des canaux calciques à haut seuil de type L, générant un courant calcique supplémentaire (I_L). Ensemble, ces deux courants permettent d'atteindre un potentiel de membrane suffisamment dépolarisé pour générer des potentiels d'action en bouffées (on parle alors de plateau de potentiel). Les potentiels d'action ainsi générés sont responsables d'entrées de calcium supplémentaires et permettent de maintenir la décharge à haute fréquence. D'autre part, ces entrées de calcium permettent l'activation d'une conductance particulière : le courant I_{CAN} (pour « Nonspecific Cationic Current »). Ce courant

I_{CAN} est un courant entrant cationique, non sélectif et activé par le calcium. L'ensemble de ces entrées de calcium finit par activer les SK_{Ca} . S'ensuit alors une compétition entre le courant calcique dépolarisant et le courant potassique repolarisant. Le courant potassique prend finalement le dessus en raison de la fermeture des canaux de type L. Les SK_{Ca} permettent alors la mise en place d'une AHP durant laquelle les canaux calciques à bas seuil de type T/R pourront être dé-inactivés. Au final, les différents mécanismes d'extrusion du calcium intracellulaire entraînent l'inactivation des canaux potassiques et permettent la survenue d'une nouvelle dépolarisation membranaire jusqu'à atteindre le seuil d'activation des canaux calciques à bas seuil, afin de générer un nouveau cycle.

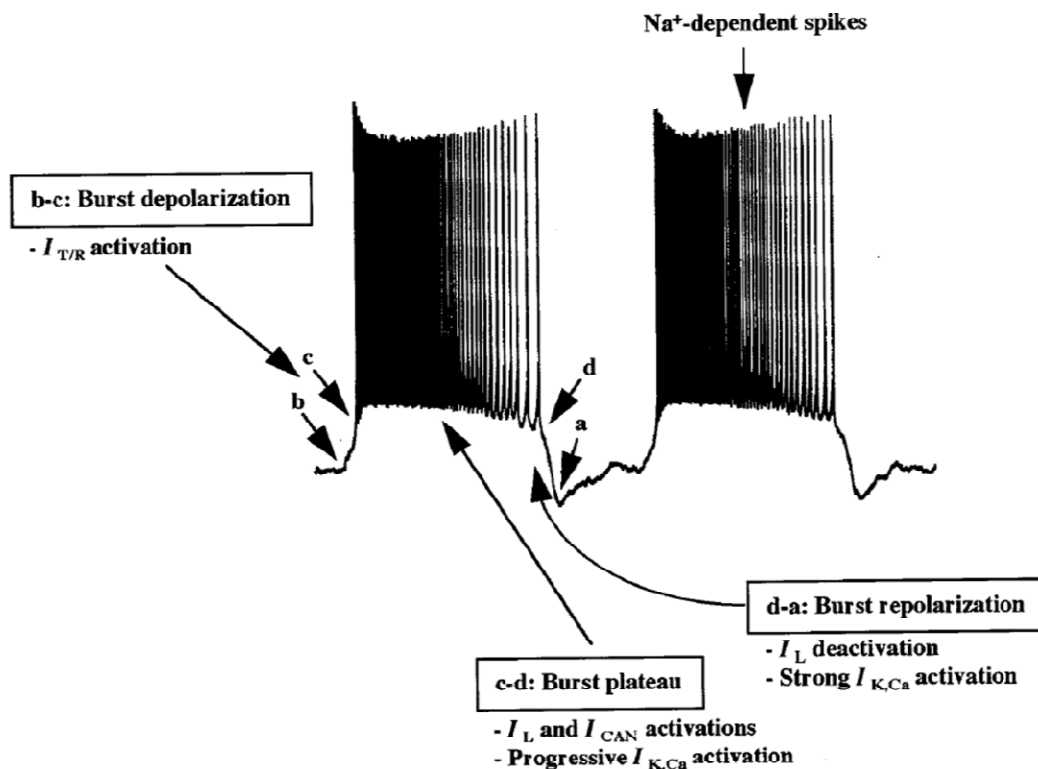


Figure 5 : Mécanismes ioniques impliqués dans les oscillations membranaires responsables de l'émission de bouffées de potentiel d'action par les neurones du NST. b-c : phase de dépolarisation précédant la mise en place du plateau de dépolarisation. c-d : plateau de dépolarisation permettant l'émission de potentiel d'action en bouffées. d-a : phase de repolarisation Modifié d'après Beurrier et al., 1999.

Le plateau de potentiel décrit ci-dessus ne résulte pas seulement d'oscillations du potentiel de membrane. En effet, l'injection artificielle de courant dépolarisant ou l'activation des entrées synaptiques glutamatergiques sont également à l'origine de la mise en place du plateau de potentiel dépolarisé. Cependant, ce phénomène n'est possible que si la membrane est hyperpolarisée, ce qui suggère l'intervention des afférences GABAergiques du GPe (Bevan et al., 2000). Dès lors, la mise en place du plateau de potentiel nécessitera l'intervention de

conductances dépendantes du voltage, et plus précisément de canaux qui s'activent à des potentiels très négatifs, comme les canaux calciques de type T (Otsuka et al., 2001; Otsuka et al., 2004).

1.2.3.c : Physiologie de la voie subthalamo-nigrale.

Les fibres du NST innervent la SNr à partir de sa région ventro-médiane puis s'étendent dans une direction rostro-caudale (Hamani et al., 2004). Les axones du NST innervant la SNr donnent lieu à de nombreuses ramifications qui peuvent former des synapses en passant ou des boutons terminaux au niveau des neurones de la SNr. Les synapses subthalamo-nigrales sont essentiellement retrouvées au niveau des dendrites distales et proximales des neurones de la SNr (Parent and Hazrati, 1995a). Au sein des GB, la voie subthalamo-nigrale s'intègre aux voies hyperdirecte et indirecte et permet de contraster, ou plutôt d'affiner, l'activité inhibitrice de la voie directe striato-nigrale. Parmi les différentes informations concernant la physiologie de cette voie, certaines résultent d'études utilisant une stimulation électrique du NST. A haute fréquence, la stimulation d'une zone cérébrale est une technique utilisée chez l'homme comme thérapeutique de diverses pathologies (les effets et mécanismes de cette stimulation électrique seront détaillés par la suite). Délivrée en stimulation unique, elle permet chez l'animal d'étudier la physiologie de différentes voies neuronales. Concernant la voie subthalamo-nigrale, la stimulation unique du NST est à l'origine de réponses complexes au niveau de la SNr. Selon le modèle d'étude (tranches aigües de cerveau de rat sagittales *versus* horizontales ou études *in vivo*), les réponses obtenues dans la SNr sont de nature différente.

La stimulation du NST en tranches horizontales chez le rat, engendre une réponse excitatrice complexe. Elle comprend un courant post-synaptique excitateur (EPSC) précoce, monosynaptique, suivi d'une succession d'EPSCs polysynaptiques (figure 6A) (Shen and Johnson, 2006). Ce type de réponse est également retrouvé dans un modèle de tranche particulier chez la souris (BGS pour Basal Ganglia Slice), qui permet de conserver au mieux les connexions du réseau des GB (Beurrier et al., 2006). La stimulation du NST dans ce type de tranche engendre également des EPSCs présentant une composante monosynaptique précoce puis polysynaptique. Les composantes mono et polysynaptiques seraient sous-tendues par l'activation des récepteurs AMPA, accompagnées d'un courant entrant dépolarisant médié par les récepteurs NMDA. La composante polysynaptique pourrait être le reflet de l'activation des collatérales d'axones au sein du NST (Shen and Johnson, 2006; Ammari et al., 2010), elles-mêmes sous la dépendance d'une régulation GABAergique provenant du GPe. Cependant, l'existence de telles interactions au sein du NST est encore débattue (Sato et al., 2000).

Réalisée en tranches sagittales, la stimulation du NST engendre une réponse synaptique présentant à la fois une composante excitatrice et inhibitrice (Nakanishi et al., 1987; Ibanez-Sandoval et al., 2006; Bosch et al., 2011). Une étude récente montre que l'induction d'EPSC et

d'IPSC (courant post-synaptique inhibiteur) se ferait de façon concomitante. Au final, et en fonction de la prépondérance de l'une ou l'autre des composantes, la stimulation du NST pourrait générer une excitation ou une inhibition des neurones de la SNr (figure 6B) (Bosch et al., 2011). Les réponses excitatrices sont monosynaptiques et résultent de l'activation des fibres subthalamo-nigrales. Plus précisément, les études pharmacologiques ont montré que ces EPSCs étaient médiés majoritairement par les récepteurs glutamatergiques ionotropiques de type AMPA (à 60%), mais également par les récepteurs NMDA (à 40%, ce qui constitue une part importante en comparaison avec d'autres structures) (Ibanez-Sandoval et al., 2006). La composante inhibitrice est également monosynaptique et pourrait être la conséquence de l'activation des fibres pallido-nigrales passant à proximité du NST et préservées par le plan de coupe sagittal.

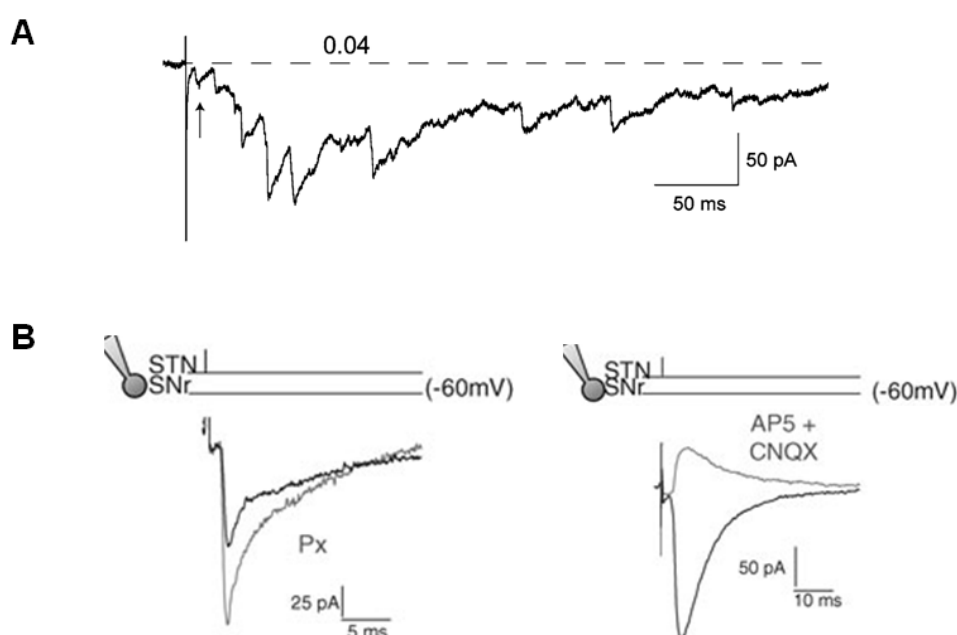


Figure 6 : Différents types de réponses synaptiques des neurones de la SNr suite à une stimulation électrique unique du NST réalisée en tranche chez le rat en fonction du plan de coupe. A. Enregistrement en cellule entière des courants synaptiques obtenus après stimulation du NST pendant 100 μ s à 400 μ A en tranche horizontale. La stimulation du NST engendre un courant complexe mono puis polysynaptique. D'après Shen and Johnson, 2006. B. Enregistrement en cellule entière des courants synaptiques obtenus après stimulation du NST pendant 100 μ s à une intensité nécessaire à l'induction d'une réponse synaptique, dans un modèle de tranche sagittale. La stimulation du NST engendre un courant présentant une composante excitatrice et inhibitrice, révélée par l'application d'antagonistes des récepteurs GABAergiques (à gauche) ou glutamatergiques (à droite). D'après Bosch et al., 2011.

L'ensemble de ces informations démontre que la transmission subthalamo-nigrale est un phénomène complexe faisant appel à diverses interactions entre plusieurs boucles neuronales. Enfin, cette voie est soumise à de nombreuses modulations permettant de réguler la transmission glutamatergique et, par conséquent, l'activité neuronale de la SNr. Les différents acteurs de cette régulation seront décrits ultérieurement (§II.3).

I.2.4. La substance noire compacte

Au sein des GB, la dopamine revêt un rôle majeur car elle permet de réguler l'activité de l'ensemble du réseau.

Située au niveau du mésencéphale, la substance noire se divise en deux parties anatomiquement et fonctionnellement distinctes. La SNc, située au niveau dorsal, est une zone dense en neurones dopaminergiques. La SNr présente une densité neuronale beaucoup plus faible et contient principalement des neurones de projections GABAergiques. Enfin, ces deux structures se recoupent dans une zone latérale que l'on appelle la SNl (pour *Substantia Nigra pars lateralis*).

La SNc constitue, avec l'ATV, la principale source de dopamine des GB et projette principalement vers le striatum dorsal. Les neurones dopaminergiques de la SNc peuvent être regroupés en deux catégories en fonction de l'expression ou non d'une protéine de liaison au calcium (Calcium-Binding Protein). La voie nigro-striée empreinte un réseau de fibres, le MFB pour « Medial Forebrain Bundle », et envoie de nombreuses collatérales d'axones notamment vers le NST, le GPe ou le thalamus (Guatteo et al., 2009; Prensa et al., 2009). Enfin, la SNc libère de la dopamine au niveau de la SNr *via* ses dendrites qui s'étendent tout le long de la SNr (Cheramy et al., 1981; Rommelfanger and Wichmann, 2010). Concernant les afférences, la SNc est la cible de projections GABAergiques en provenance du striatum, du GPe et de la SNr (Smith and Bolam, 1990). Elle reçoit également des afférences glutamatergiques en provenance du NST et du PPN (Kita and Kitai, 1987). Enfin, notamment chez le rat, la SNc est la structure des GB qui reçoit le plus d'afférences cholinergiques en provenance du PPN (Mena-Segovia et al., 2008).

Les neurones dopaminergiques de la SNc sont doués d'une activité spontanée permettant la libération tonique de dopamine dans les GB. Cette activité « pace-maker » est sous-tendue par des oscillations du potentiel de membrane. Contrairement au NST, le courant sodique persistant I_{NaP} n'est pas le principal responsable de ces oscillations et il permet uniquement d'amplifier la dépolarisation. En effet, les oscillations membranaires résultent principalement d'entrées de calcium, qui ont été décrites au niveau du soma et des dendrites (Fujimura and Matsuda, 1989; Harris et al., 1989; Wilson and Callaway, 2000; Puopolo et al., 2007; Guatteo et al., 2009). Les potentiels d'action des neurones dopaminergiques sont également suivis d'une AHP, importante pour réguler la fréquence de décharge. A l'instar des neurones du NST, la phase d'AHP des neurones de la SNc résulte de l'activation des SK_{Ca} (canaux potassiques activés par le calcium) durant le potentiel d'action (Harris et al., 1989; Wilson and Callaway, 2000). Enfin, la fréquence de décharge est modulée par l'action d'auto-récepteurs inhibiteurs de type D2. En activant ces récepteurs, la dopamine libérée au niveau dendritique, permet de diminuer la fréquence de décharge (Guatteo et al., 2009).

In vivo, les neurones dopaminergiques ont la capacité de décharger en bouffée. Ainsi, l'activité spontanée régulière serait responsable d'une libération tonique de dopamine alors que la décharge en bouffée permettrait une libération phasique de celle-ci. Ces deux modes de transmissions sont impliqués dans différentes fonctions physiologiques. Au repos, la dopamine est principalement libérée de manière tonique, permettant une régulation basale de l'activité des différents noyaux des GB. La libération phasique, présente dans quelques neurones au repos, s'étend à toute la population neuronale lors d'une stimulation externe (comme une stimulation sensorielle) ou lors de la réalisation d'une action (comme un comportement moteur dirigé vers un but) (Hyland et al., 2002; Guatteeo et al., 2009). La modification du patron de décharge, responsable de la libération tonique *versus* phasique de dopamine, est opérée par les différentes entrées synaptiques. En effet, le blocage de la transmission GABAergique ou l'augmentation de la transmission glutamatergique induit la mise en place d'un patron de décharge en bouffées et ce, *in vivo* comme *in vitro* (Lee and Tepper, 2009; Mrejeru et al., 2011).

Pour résumer, grâce aux régulations intrinsèques et extrinsèques, les neurones de la SNc libèrent de la dopamine de manière tonique ou phasique et veillent au bon fonctionnement du réseau des GB. Dès lors, le moindre dysfonctionnement dans la transmission dopaminergique peut donner lieu à des perturbations du réseau et aboutir à diverses pathologies comme la maladie de Parkinson en cas d'hypodopaminergie, mais également des schizophrénies (Grace, 1991), des addictions (Koob and Le Moal, 1997) ou le déficit d'attention lié à l'hyperactivité (Oades, 1987), en cas d'hyperdopaminergie.

II La Substance Noire Réticulée

II.1. Organisation et connectivité.

II.1.1. La SNr : porte de sortie des ganglions de la base

Au sein des GB, la SNr constitue, avec le GPi (ou l'EP chez les rongeurs), l'étape finale du traitement et de la transmission des informations vers le cortex. En effet, l'ensemble des informations neuronales traitées par les différentes voies des GB converge vers la SNr avant d'être transmis aux cortex moteur, sensorimoteur et associatif, *via* un relais thalamique.

Les neurones de la SNr sont principalement GABAergiques et exercent de fait une inhibition des structures cibles, que sont les noyaux ventro-médian et intralaminaire du thalamus chez le rat (Di Chiara et al., 1979; Deniau and Chevalier, 1992; Nishimura et al., 1997) ou ventro-latéral et ventro-antérieur chez le primate (Carpenter et al., 1976; Francois et al., 2002), le colliculus supérieur chez le rat et le primate (Beckstead and Frankfurter, 1982; Hikosaka et al., 2000; Mana and Chevalier, 2001), le PPN et le tegmentum méso-pontique chez le rat et le primate (Beckstead and Frankfurter, 1982; Parent et al., 1983; Rye et al., 1987; Spann and Grofova, 1991; Grofova and Zhou, 1998). Cette inhibition est d'autant plus importante qu'elle s'opère de façon tonique. En effet, de la même façon que d'autres noyaux des GB, les neurones nigraux sont capables d'émettre des potentiels d'action de façon spontanée (*i.e.* sans stimulus synaptique) (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997). Ainsi, au repos, la SNr agit comme un « frein » en générant une inhibition constante de ses cibles.

La transmission d'information des GB au cortex, essentielle à la réalisation d'une action, nécessite donc une levée de l'inhibition exercée par la SNr (Hikosaka, 2007). Un contrôle fin et précis de l'activité neuronale nigrale est donc nécessaire, afin de permettre la bonne transmission de l'information. La régulation de cette activité s'exerce à différents niveaux, par le biais de certaines conductances intrinsèques (que nous détaillerons plus tard dans ce chapitre) et de manière extrinsèque, sous l'influence des noyaux afférents. La régulation exercée par les structures afférentes présente une grande complexité. En effet, les neurotransmetteurs impliqués sont de natures très diverses et les actions qu'ils opèrent sont complexes voire opposées. Néanmoins, les deux acteurs principaux impliqués dans la régulation de l'activité neuronale de la SNr restent le glutamate et le GABA. Ainsi, chez le rat comme chez le primate, l'activité neuronale de la SNr est à la fois inhibée (par l'action du GPe, du striatum et des collatérales d'axones de la SNr, responsables d'une libération de GABA) et activée (par l'action du NST) (Yoshida and Precht, 1971; Nitsch and Riesenberger, 1988; Smith and Bolam, 1989; Robledo and Feger, 1990; Langer et al., 1991; Sato et al., 2000). De ce fait, la modulation de cette balance

entre excitation et inhibition permet de réguler l'activité de la structure de sortie des GB, responsable de la transmission des informations neuronales. Au repos, il existe un certain équilibre entre l'activation et l'inhibition des structures de sortie. Lorsque les conditions le requièrent, c'est-à-dire lors de la réalisation d'une action orchestrée par les GB, cet équilibre est modifié et permet une levée ou un renforcement de l'inhibition exercée par la SNr (DeLong, 1990; Hikosaka, 2007).

II.1.2. Organisation anatomo-fonctionnelle de la SNr

Comme nous l'avons décrit précédemment, les GB sont organisés en respectant une certaine somatotopie et traitent les informations en différentes voies parallèles. La compartimentalisation en voies parallèles, mise en place au niveau du striatum, est d'autant plus efficace qu'elle est conservée jusqu'à la SNr. En effet, grâce à une organisation particulière, mise en évidence chez le rat, la SNr maintient l'organisation topographique cortico-striatale (Kolomiets et al., 2003; Deniau et al., 2007). Ainsi, les afférences (figure 7A) (Deniau et al., 1996), les efférences (figure 7B) (Deniau and Chevalier, 1992) et l'arborisation dendritique (Mailly et al., 2001) respectent une géométrie laminaire particulière, organisée en « pelures d'oignon » autour d'un noyau central, situé au niveau dorsolatéral et s'étendant le long de l'axe rostrocaudal de la SNr.

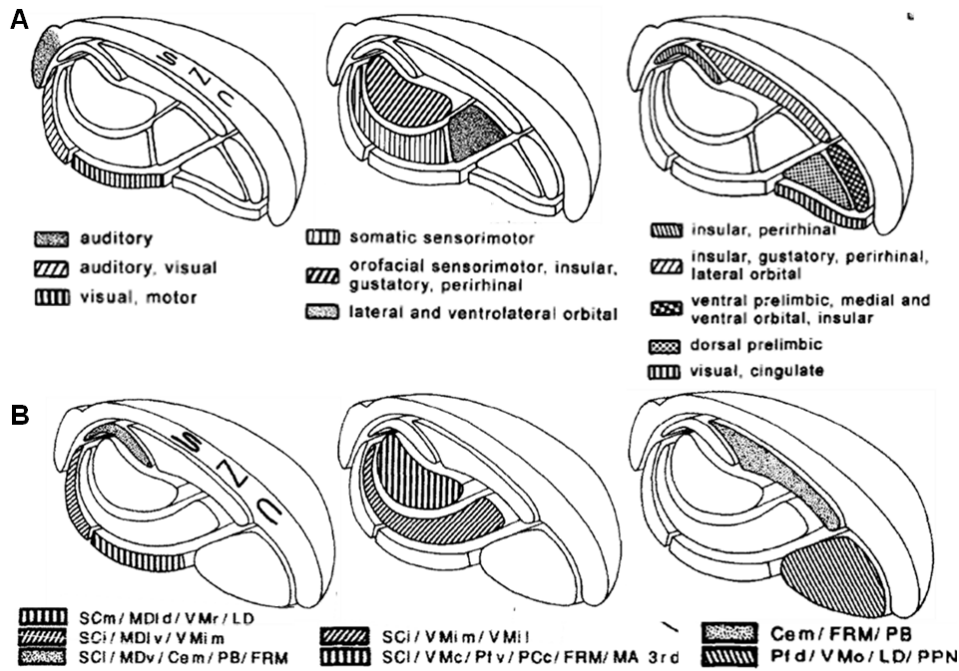


Figure 7 : L'organisation de la substance noire réticulée présente une géométrie particulière dite en pelures d'oignon. Les neurones de la SNr présentent une organisation en couches laminaires permettant la conservation de la somatotopie cortico-striatale. Les afférences (A) et les efférences (B) respectent cette organisation. Modifié d'après Deniau and Chevalier, 1992 (A), Deniau et al., 1996 (B). Cem : central medial thalamic nucleus. FRM : mesencephalic reticular formation. LD : lateral dorsal thalamic nucleus. MA3rd : medial accessory oculomotor nucleus. MDld : mediodorsal thalamic nucleus laterodorsal. MDlv : mediodorsal thalamic nucleus lateroventral. MDv : mediodorsal thalamic nucleus ventral. PB : parabrachial nuclei. PCc : paracentral thalamic nucleus caudal. Pfd : parafascicular thalamic nucleus dorsal. Pfv : parafascicular thalamic nucleus ventral. SCi : superior colliculus intermediate. SCl : superior colliculus lateral. SCm : superior colliculus medial. SNC : substantia nigra pars compacta. VMil : ventral medial thalamic nucleus intermediolateral. VMim : ventral medial thalamic nucleus intermediomedial. VMo : ventral medial thalamic nucleus oral. VMr : ventral medial thalamic nucleus rostral..

Au sein de cette structure, les neurones de projection GABAergiques émettent des collatérales d'axones responsables d'interactions inhibitrices locales, mises en évidence chez le rat (Deniau et al., 1982) et le singe (Schwyn and Fox, 1974). Chez le rat, ces collatérales respectent également la disposition en « lamelles d'oignon » décrite ci-dessus (Mailly et al., 2003). Cet arrangement intrinsèque suggère que les interactions intra-nigrales se font préférentiellement entre des neurones en lien avec un même territoire, renforçant ainsi la vision de circuits parallèles de l'information. L'ensemble de ces caractéristiques anatomiques sous-entend que les informations sont ségréguées en différentes voies parallèles, permettant d'en conserver la spécificité depuis l'entrée jusqu'à la sortie du réseau des GB.

Cependant, à l'instar du striatum, certaines caractéristiques tendent à complexifier cette vision de parallélisme des voies de l'information. L'arborisation dendritique n'est, par exemple, pas complètement restreinte à un territoire nigral particulier mais s'étend aux territoires adjacents créant ainsi un *continuum* entre les différents « canaux » de l'information (Mailly et al., 2001).

De même, il existe des différences morphologiques entre les neurones situés dans les parties dorsales et ventrales de la SNr: les neurones situés dans la partie ventrale présentent un corps cellulaire plus petit et une arborisation dendritique moins étendue et ramifiée. Cette dichotomie engendrerait une meilleure intégration de l'information dans la zone dorsale (Cebrian et al., 2007). Par ailleurs, la réception de l'information semble se faire préférentiellement le long de l'axe rostro-caudal en raison d'une étendue dendritique plus importante le long de cet axe (Cebrian et al., 2007). Enfin, les interactions entre les afférences du NST et du striatum complexifient cette organisation fonctionnelle (Kolomiets et al., 2003). En conclusion, la SNr préserve la somatotopie corticale au niveau de ses entrées et sorties mais permet également un certain degré de recouvrement des différents territoires fonctionnels.

II.2. Physiologie des neurones nigraux

II.2.1. Caractéristiques morphologiques

La SNr présente une densité neuronale relativement faible chez le rat comme chez le primate (Juraska et al., 1977; Yelnik et al., 1987). Elle se compose principalement de neurones GABAergiques mais contient également quelques neurones dopaminergiques. Ainsi, chez le rat, on estime le ratio neurones dopaminergique/GABAergique à 0.11 ± 0.02 (Nair-Roberts et al., 2008). Ces neurones présentent de nombreuses différences, tant sur le plan morphologique qu'électrophysiologique. Les neurones GABAergiques sont caractérisés par un corps cellulaire de grosse taille pouvant présenter différentes formes (fusiforme, triangulaire, polygonale, ovoïde ou ronde). Une à cinq dendrites primaires sont émises depuis le soma et présentent un degré de ramification plus important au niveau des parties distales (Mailly et al., 2001; Cebrian et al., 2007). Les quelques neurones dopaminergiques sont regroupés en clusters au sein de la SNr et sont des neurones multipolaires (Fallon, 1995). Plus précisément, ces neurones sont surtout retrouvés au niveau caudal et sont organisés en couches verticales séparées par des aires dépourvues de neurones dopaminergiques. Les neurones GABAergiques sont plus nombreux au niveau rostral et s'organisent selon l'axe dorsoventral remplissant ainsi les zones laissées vacantes par les neurones dopaminergiques (Gonzalez-Hernandez and Rodriguez, 2000).

II.2.2. Caractéristiques électrophysiologiques

Les neurones GABAergiques et dopaminergiques présentent de nombreuses différences du point de vue électrophysiologique. Ces différences sont la conséquence d'une spécificité d'expression des canaux ioniques membranaires et se reflètent dans la typologie de leur potentiel d'action jusqu'à leur activité de décharge (Zhou and Lee, 2011). Le potentiel d'action des neurones GABAergiques présente une plus grande amplitude, une durée plus courte et un seuil d'émission

plus négatif (figure 8) (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997; Rohrbacher et al., 2000). Les neurones dopaminergiques sont doués d'une forte rectification entrante, faible voire inexistante dans les neurones GABAergiques (figure 8) (Richards et al., 1997; Rohrbacher et al., 2000; Atherton and Bevan, 2005; Lee and Tepper, 2007; Ding et al., 2010; Ding et al., 2011; Zhou and Lee, 2011). Cette rectification est soutenue par un courant de type I_h , courant entrant porté par les ions K^+ et Na^+ et d'activation lente. Le courant I_h est activé lors d'hyperpolarisations et contribue à ramener le potentiel de membrane à des valeurs proches du seuil d'émission du potentiel d'action. Il est porté par des canaux particuliers perméables au K^+ et Na^+ , les canaux HCN (pour hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels) (Chu and Zhen, 2010). Certaines études décrivent également la présence d'un courant de type I_A , responsable d'une rectification sortante (Liss et al., 2001). Le courant I_A est un courant sortant potassique précoce et transitoire (qui s'inactive rapidement). Ces neurones diffèrent également du point de vue de leur fréquence de décharge. En effet, les neurones GABAergiques présentent des fréquences de décharge relativement élevées (de 25 à 65 Hz *in vivo* selon les espèces, et de 10 à 15 Hz *in vitro*) alors que les neurones dopaminergiques ont une fréquence de décharge beaucoup plus faible aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (1 à 6 Hz) (Zhou and Lee, 2011).

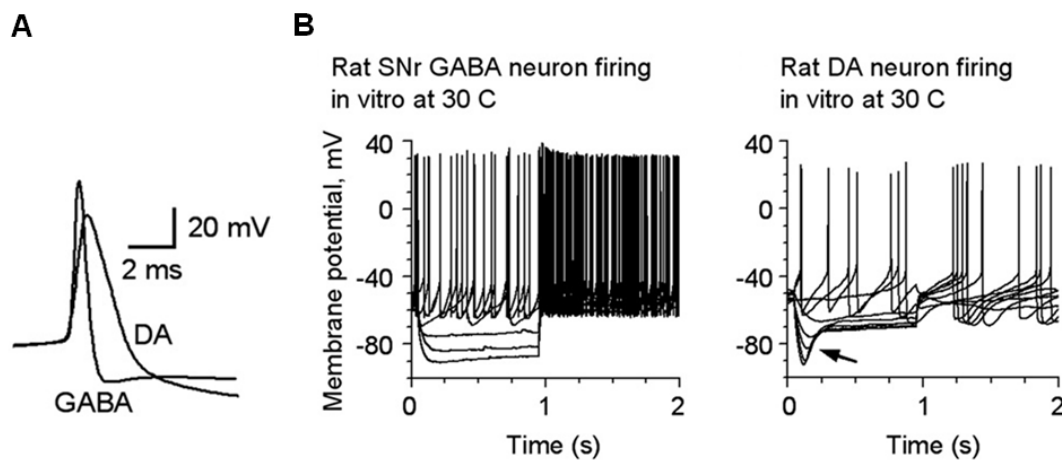


Figure 8 : Les neurones GABAergiques et dopaminergiques de la SNr présentent différentes caractéristiques électrophysiologiques. Enregistrements électrophysiologiques en configuration cellule entière et en mode courant imposé de l'activité d'un neurone GABAergique ou dopaminergique de la SNr chez le rat. Les potentiels d'action des neurones GABAergiques sont de plus grande amplitude et de plus courte durée (A). La rectification entrante est plus prononcée pour les neurones dopaminergiques qui présentent une fréquence de décharge plus faible (B). D'après Ding et al., 2011. Flèche: courant I_h en réponse à des sauts de courant hyperpolarisant.

L'ensemble de ces différences électrophysiologiques s'explique par une différence d'expression des canaux ioniques membranaires responsables des phases de dépolarisation et de repolarisation membranaires. La phase de dépolarisation résulte d'un courant entrant sodique qui s'inactive

rapidement, ce qui lui vaut le nom de courant sodique transitoire (I_{NaT}). Ce courant est généré par des canaux sodiques dépendants du voltage (les Na_v). Les Na_v sont composés d'une sous-unité α formant le pore du canal et de deux sous-unités β qui en régulent la fonction. Des différences de composition au niveau de ces sous-unités sont à l'origine des différences de conductance et de cinétique portées par les I_{NaT} entre les deux types neuronaux (Ding et al., 2010). Concernant la phase de repolarisation, elle résulte de l'activation de canaux potassiques dépendants du voltage (K_v). Des différences d'expression au niveau de ces canaux sont également retrouvées entre les deux types neuronaux où ils génèrent deux types de courants distincts (Ding et al., 2011). L'ensemble de ces différences confèrent aux neurones de la SNr, une signature électrophysiologique spécifique.

Comme beaucoup d'autres noyaux des GB, les neurones de la SNr sont doués d'une activité spontanée de type « pace-maker » (Nakanishi et al., 1987; Atherton and Bevan, 2005). Ce type d'activité nécessite une dépolarisation membranaire afin d'atteindre le seuil d'émission du potentiel d'action. Le mécanisme impliqué dans cette dépolarisation fait appel au même courant que celui décrit dans le NST : le I_{NaP} (courant sodique persistant) (Atherton and Bevan, 2005). Cependant, ce courant n'est activé que par des potentiels plus positifs que le potentiel de repos des neurones de la SNr, ce qui suggère l'intervention d'un second type de courant dépolarisant. Ce courant de nature sodique, décrit par Fu-Wen Zhou et collaborateurs (2008), est porté par des canaux actifs de manière constitutive : les canaux TRPC3 (figure 9) (Zhou et al., 2008). Les canaux TRP (pour « Transient Receptor Potential ») comptent sept sous-familles de canaux dont les TRPM (pour melastatin), les TRPC (pour canonical), ou encore les TRPV (pour vanilloïde). Ce sont des canaux cationiques non sélectifs, présentant différents modes d'activation [pour revue voir (Nilius and Owsianik, 2011)]. Ainsi, le courant résultant des TRPC3 permet de dépolariser légèrement la membrane avant d'être suppléé par le courant I_{NaP} . Ensemble, ces deux types de courants contribuent à dépolariser suffisamment la membrane des neurones GABAergiques pour atteindre le seuil d'émission du potentiel d'action (Zhou et al., 2008).

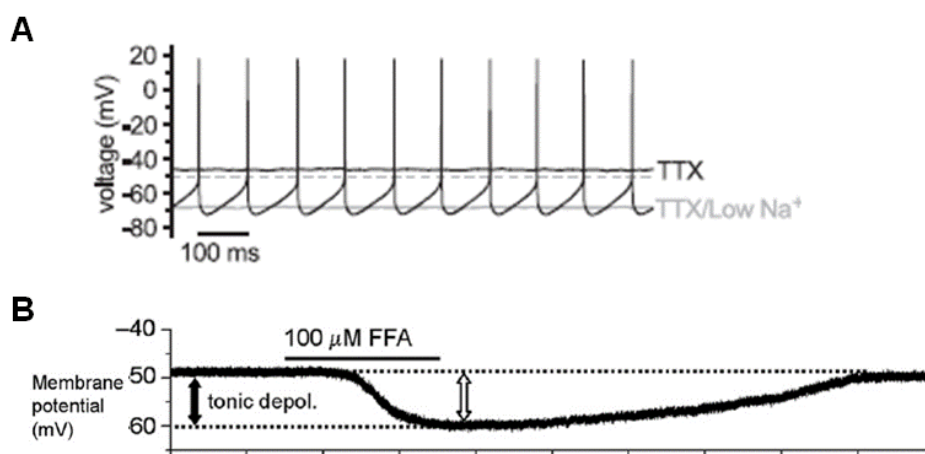


Figure 9 : Les neurones GABAergiques de la SNr sont spontanément dépolarisés par deux types de courants sodiques. Enregistrements en cellule entière et en courant imposé d'un neurone GABAergique. A. L'inhibition des canaux sodiques dépendants du voltage par la tetrodotoxine (TTX) inhibe l'émission de potentiels d'action. La diminution de concentration du sodium extracellulaire induit une hyperpolarisation membranaire nécessitant l'intervention d'un courant sodique pour induire une dépolarisation. D'après Atherton and Bevan 2005. B. Après inhibition des potentiels d'action par application de TTX, le blocage des canaux TRPC3 par l'acide flufenamic (FFA) induit une hyperpolarisation membranaire, preuve de l'intervention de ces canaux dans la dépolarisation des neurones nigraux. D'après Zhou et al., 2008

Comme nous l'avons décrit précédemment, la modulation de l'AHP permet de réguler la fréquence de décharge des neurones. Ce phénomène est le même pour les neurones de la SNr (l'entrée de calcium par les canaux calciques dépendants du voltage active les SK_{Ca} responsables de l'AHP) (Atherton and Bevan, 2005). Dans les neurones GABAergiques de la SNr, l'entrée de calcium est médiée par les canaux de type T et de type N (Yanovsky et al., 2005).

De façon similaire à celle décrite pour les neurones du NST, les neurones de la SNr sont capables d'émettre des potentiels d'actions en bouffées, sous-tendus par l'induction d'un plateau de potentiel dépolarisé. Ce plateau de potentiel résulte également d'entrées de calcium, responsables de l'activation de la conductance sodique I_{CAN} (décrite au niveau du NST). Ces entrées de calcium seraient permises par l'activation des canaux calciques de type L (lors d'hyperpolarisations) ou par l'activation des récepteurs NMDA (suite à une libération de glutamate par les neurones du NST) (Lee and Tepper, 2007). Par ailleurs, la conductance I_{CAN} résulte, au niveau de la SNr, de l'activation de canaux TRPM de type 2. La présence de ce plateau de potentiel confère donc aux neurones de la SNr, la capacité de décharger en « bursts ». Ce phénomène est relativement peu fréquent en condition physiologique mais prend de l'importance dans certaines conditions pathologiques comme nous le verrons par la suite.

Au même titre que les autres noyaux des GB, la diversité et la spécificité d'expression des canaux ioniques de la SNr confèrent aux neurones nigraux une signature électrique bien

spécifique. De plus, les nombreuses conductances qui en résultent constituent un premier niveau de régulation de l'activité neuronale de la SNr, primordiale pour la bonne transmission des informations entre les GB et les aires corticales.

II.3. Afférences de la SNr : régulation de l'activité neuronale par les neurotransmetteurs et neuromodulateurs

Outre les régulations intrinsèques décrites ci-dessus, l'activité des neurones de la SNr est modulée de manière fine et complexe par l'action de nombreux neurotransmetteurs provenant de structures appartenant ou non aux GB. Les neurones nigraux expriment une pléiade de récepteurs spécifiques de ces neurotransmetteurs, avec une localisation sub-cellulaire particulière qui complexifie l'intégration de leurs effets. L'existence d'interactions positives ou négatives entre les différents récepteurs complique d'autant plus ces régulations externes exercées sur l'activité neuronale nigrale. Dans cette partie, nous décrirons les différents neurotransmetteurs impliqués dans la régulation de l'activité nigrale. Au même titre que les autres noyaux des GB, la SNr est notamment sous l'influence du GABA et du glutamate, responsables de la majeure partie de la régulation.

II.3.1. Le GABA

Les afférences GABAergiques de la SNr proviennent de différents noyaux des GB. Notamment, le striatum (Nitsch and Riesenberg, 1988) et le GPe (Smith and Bolam, 1990; Sato et al., 2000) projettent tous deux sur la SNr. De plus, l'émission de collatérales d'axones par les neurones nigraux eux-mêmes implique la présence d'inhibitions GABAergiques locales (Deniau et al., 1982).

Il existe des différences majeures entre les voies pallido-nigrales et striato-nigrales. Tout d'abord au niveau des contacts synaptiques: les synapses striato-nigrales sont retrouvées au niveau des dendrites distales alors que les synapses pallido-nigrales forment de larges paniers autour du soma et des dendrites proximales (Smith and Bolam, 1991; von Krosigk et al., 1992). D'autre part, le striatum et le GPe sont chacun le siège d'une activité neuronale particulière : comme nous l'avons décrit précédemment, les MSNs sont relativement silencieux à l'état basal et peuvent adopter un mode de décharge en bouffées lors de fortes entrées corticales. Les neurones pallidaux, quant à eux, présentent une fréquence de décharge basale très élevée (50 à 70 Hz) et voient leur activité entrecoupée de pauses. Ces particularités, responsables des patrons de transmission différents voire antagonistes, laissent penser que le striatum et le GPe exercent des régulations contraires sur la structure de sortie. Cependant, les synapses striato-nigrales et pallido-nigrales présentent deux formes de plasticités synaptiques opposées, aboutissant au final

à des actions synergiques (figure 10). En effet, l'équipe de William M. Connelly et collaborateurs (2010) ont mis en évidence chez le rat une facilitation de la transmission striato-nigrale et une dépression de la transmission pallido-nigrale (figure 10A). Ainsi, lorsque le striatum est activé par de fortes entrées corticales, la facilitation engendrée permet une augmentation de la transmission GABAergique striato-nigrale. En parallèle, l'augmentation de la transmission striato-pallidale contrecarre l'activité à haute fréquence du GPe et permet une levée de la dépression synaptique pallido-nigrale. Donc, lorsque les conditions le requièrent, le striatum et le GPe contribuent tous deux à augmenter la transmission GABAergique et de fait, à inhiber l'activité neuronale nigrale (figure 10B) (Connelly et al., 2010).

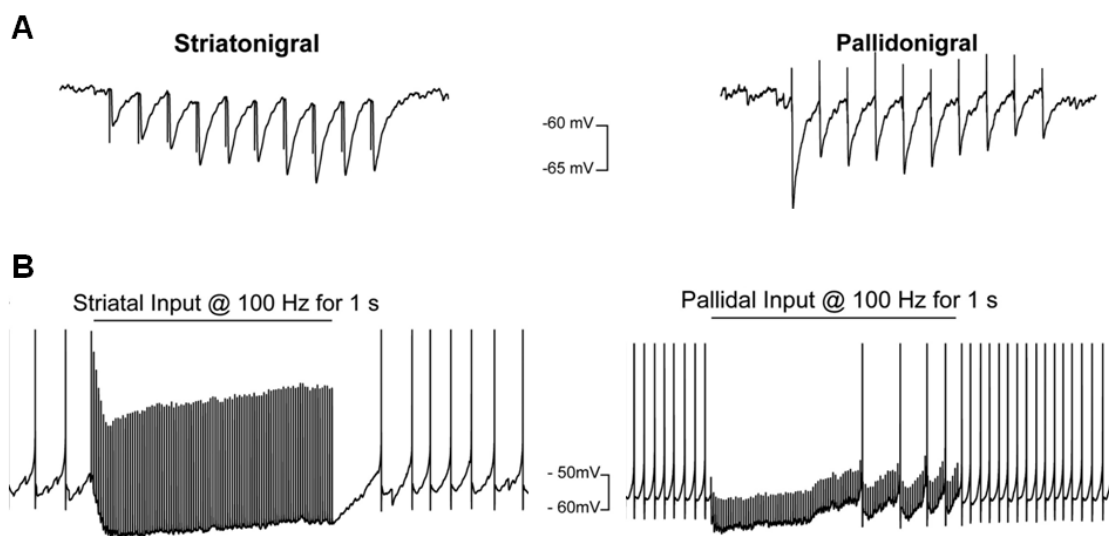


Figure 10 : *Les afférences striato-nigrales et pallido-nigrales régulent l'activité des neurones de la SNr. A. Enregistrement des plasticités synaptiques (induites par une stimulation des voies striato-nigrales ou pallido-nigrales 1 sec, 100 Hz) dans les neurones du striatum ou du GPe. Les synapses striato-nigrales et pallido-nigrales expriment différents types de plasticité (facilitation et dépression respectivement). B. Enregistrement de l'activité des neurones de la SNr suite à la stimulation du striatum ou du GPe : la facilitation des synapses striato-nigrales et la levée de la dépression des synapses pallido-nigrales engendrent une augmentation de la libération de GABA dans la SNr. Modifié d'après Connelly et al., 2010.*

Le GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur, exerce son effet *via* l'activation de deux types de récepteurs. Les récepteurs ionotropiques (GABA_A) et métabotropiques (GABA_B). L'action des récepteurs ionotropiques s'opère *via* un couplage à une conductance chlorure et engendre une hyperpolarisation membranaire. Celle des récepteurs métabotropiques dépend du type de protéine G à laquelle ils sont liés. La liaison à la protéine de type G_o entraîne une diminution de la conductance calcique (au niveau pré-synaptique) ou une augmentation de la conductance potassique (au niveau post-synaptique). La liaison à la protéine de type G_i diminue l'activité de l'adénylate cyclase.

Au niveau de la SNr, les deux types de récepteurs sont présents car une application intracérébrale de muscimol ou de baclofen (agonistes spécifiques des récepteurs GABA_A et GABA_B respectivement) engendre un comportement rotatoire controlatéral à l'injection (Ikeda et al., 2010).

Les récepteurs ionotropiques de type GABA_A, responsables d'une transmission synaptique rapide, sont largement distribués dans la SNr. Concernant leur distribution cellulaire, les récepteurs de type GABA_A sont essentiellement localisés au niveau des terminaisons post-synaptiques (Shen and Johnson, 1997; Zhang et al., 2008). Cependant, ils ont également été décrits au niveau pré-synaptique des terminaisons striato- et pallido-nigrales (Nicholson et al., 1992).

Les récepteurs métabotropiques de type GABA_B sont, quant à eux, essentiellement décrits au niveau des terminaisons pré-synaptiques où ils modulent la transmission GABAergique mais également glutamatergique. En effet, au niveau des synapses pallido- et striato-nigrales, ils contribuent à diminuer la transmission GABAergique (Floran et al., 1988; Shen and Johnson, 1997; Boyes and Bolam, 2003), alors que leur activation au niveau des synapses subthalamo-nigrales permet une diminution de la transmission excitatrice (Shen and Johnson, 1997; Boyes and Bolam, 2003; Cortes et al., 2010).

Néanmoins, les récepteurs de type GABA_B ne sont pas restreints au niveau des terminaisons pré-synaptiques et se retrouvent également au niveau des boutons post-synaptiques, à la fois dans des zones synaptiques et extra-synaptiques (Boyes and Bolam, 2003).

Le GABA est donc un acteur important dans la régulation de l'activité neuronale de la SNr. Son action directe au niveau post-synaptique permet de diminuer l'activité nigrale mais son action au niveau pré-synaptique complexifie cette régulation, en agissant à la fois sur les transmissions excitatrices et inhibitrices.

II.3.2. Le glutamate

Les sources de glutamate de la SNr chez le rat proviennent des afférences corticales (Naito and Kita, 1994), de celles du PPN (Takakusaki et al., 1996) mais principalement de celles du NST (Robledo and Feger, 1990) dont les fibres arborisent toute la SNr en formant des synapses sur les dendrites proximales et distales (Parent and Hazrati, 1995a). Au même titre que le GABA, le glutamate exerce son action par le biais de l'activation de récepteurs métabotropiques et ionotropiques, et régule l'activité neuronale de la SNr de manière complexe.

Les récepteurs ionotropiques sont responsables d'une transmission synaptique rapide. Ils comprennent les récepteurs de types AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate), NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et kaïnate. Au niveau des neurones de la SNr, les

récepteurs de type AMPA et NMDA sont largement distribués et sont retrouvés au niveau post-synaptique des synapses asymétriques (Gotz et al., 1997; Chatha et al., 2000).

Les récepteurs métabotropiques se distribuent en 8 sous-types différents : mGluR1 à 8 regroupés en 3 groupes. Les mGluRs du groupe I (mGluR 1 et 5) sont couplés positivement à la phospholipase C (PLC) et sont majoritairement retrouvés au niveau post-synaptique. Ils ont également été décrits au niveau pré-synaptique où ils peuvent contribuer à diminuer ou augmenter la libération de neurotransmetteurs [pour revue voir (Niswender and Conn, 2010)]. Dans la SNr, ils ont été décrits au niveau pré- et post-synaptique. Au niveau post-synaptique, ils engendrent une dépolarisation directe des neurones nigraux. Au niveau pré-synaptique, ils sont retrouvés sur les terminaisons glutamatergiques (Wittmann et al., 2001a) et GABAergiques (Marino et al., 2001) où leur action tend à diminuer la transmission. Ainsi, de par son action sur les mGluRs du groupe I, le glutamate exerce des actions antagonistes, contribuant à activer et/ou inhiber l'activité neuronale de la SNr. Cette dualité d'action pré/post-synaptique pourrait servir de filtre de l'information en augmentant le rapport signal sur bruit. En effet, la diminution de la transmission glutamatergique au niveau pré-synaptique servirait de filtrage, permettant ainsi de transmettre uniquement les signaux de forte intensité. En parallèle, l'action au niveau post-synaptique permettrait d'accroître la sensibilité au glutamate. Ainsi, lors de transmission de signaux de forte intensité, l'effet du glutamate serait potentialisé (Wittmann et al., 2001b). Les mGluRs du groupe II (mGluR 2 et 3) sont couplés négativement à l'adénylate cyclase. Ils sont majoritairement situés au niveau pré-synaptique où ils inhibent la libération de neurotransmetteurs. Ils peuvent également être situés au niveau post-synaptique où ils sont responsables d'une hyperpolarisation membranaire (Niswender and Conn, 2010). Dans la SNr, ils sont exclusivement retrouvés au niveau pré-synaptique des terminaisons subthalamo-nigrales et sont responsables d'une diminution de la transmission glutamatergique (Bradley et al., 2000). Cette diminution serait même suffisante à l'induction d'une dépression à long terme (LTD) au niveau de ces synapses (Johnson et al., 2011). Les mGluRs du groupe III (mGluR 4, 6 à 8) présentent les mêmes propriétés que ceux du groupe II (Niswender and Conn, 2010). Au sein de la SNr, ils sont retrouvés au niveau pré-synaptique des synapses excitatrices et inhibitrices et permettent une diminution des transmissions glutamatergique et GABAergique (Wittmann et al., 2001b).

Au même titre que le GABA, le glutamate occupe donc une place essentielle dans la régulation de l'activité neuronale nigrale. Les actions complexes de ces deux neurotransmetteurs sont à l'origine d'une balance fine et constante entre excitation et inhibition de l'activité neuronale. Cependant, cet équilibre ne se limite pas aux effets de ces deux neurotransmetteurs mais résulte également de l'action de nombreux autres acteurs, dont la dopamine.

II.3.3. La dopamine

Comme nous l'avons décrit précédemment, la SNc libère de la dopamine de façon tonique au niveau de la SNr. La dopamine peut également provenir des quelques neurones dopaminergiques présents dans la SNr (Rohrbacher et al., 2000). L'action neuromodulatrice de la dopamine s'effectue par le biais de différents types de récepteurs métabotropiques. Les récepteurs de type D1 (comprenant les sous-types D1 et D5) sont couplés positivement à l'adénylate cyclase et leur activation engendre une dépolarisation membranaire. A l'inverse, les récepteurs de type D2 (comprenant les D2, D3 et D4) sont couplés négativement à l'adénylate cyclase et leur activation induit une hyperpolarisation membranaire.

La régulation de l'activité de la SNr par la dopamine s'effectue de manière indirecte *via* une régulation des voies directe et indirecte. En effet, la dopamine active la voie directe *via* les récepteurs striataux de type D1 et inhibe la voie indirecte *via* les récepteurs de type D2. Cette dichotomie d'effet contribue au final à diminuer l'activité neuronale de la SNr (Gerfen et al., 1990; Kravitz et al., 2010; Chuhma et al., 2011). L'action de la dopamine n'est cependant pas restreinte au striatum car les récepteurs dopaminergiques sont largement distribués dans tout le réseau des GB. Au niveau de la SNr, les conséquences sont complexes car elles concernent à la fois les afférences GABAergiques et glutamatergiques. En raison des actions opposées des récepteurs de type D1 et D2, la dopamine contribue donc à la fois à une augmentation et à une inhibition de ces transmissions (figure 11). En effet, la présence des récepteurs de type D1 au niveau des terminaisons striato-nigrales (Floran et al., 1990; Radnikow and Misgeld, 1998; Acosta-Garcia et al., 2009; Aceves et al., 2011) et subthalamo-nigrales (Ibanez-Sandoval et al., 2006) génère une augmentation des transmissions inhibitrice et excitatrice. A l'inverse, les récepteurs de type D2 présents sur les terminaisons subthalamo-nigrales (Ibanez-Sandoval et al., 2006) et de type D4 présents sur les terminaisons pallido-nigrales (Acosta-Garcia et al., 2009; Aceves et al., 2011) sont responsables d'une diminution de ces transmissions.

Enfin, la dopamine exerce également une action directe au niveau post-synaptique où elle engendre une dépolarisation des neurones GABAergiques. Cette voie est qualifiée « d'ultra-short » en raison de la proximité des sites de libération (*i.e.* les dendrites de la SNc qui s'étendent dans la SNr) et des sites d'action de la dopamine (les récepteurs post-synaptiques). L'action de la dopamine au sein de cette voie résulte d'une co-activation des récepteurs de type D1 et D5, responsable d'une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation serait permise par une augmentation de l'activité du canal TRPC3 (décrit précédemment comme intervenant dans l'activité « pace-maker ») (figure 11) (Zhou et al., 2009).

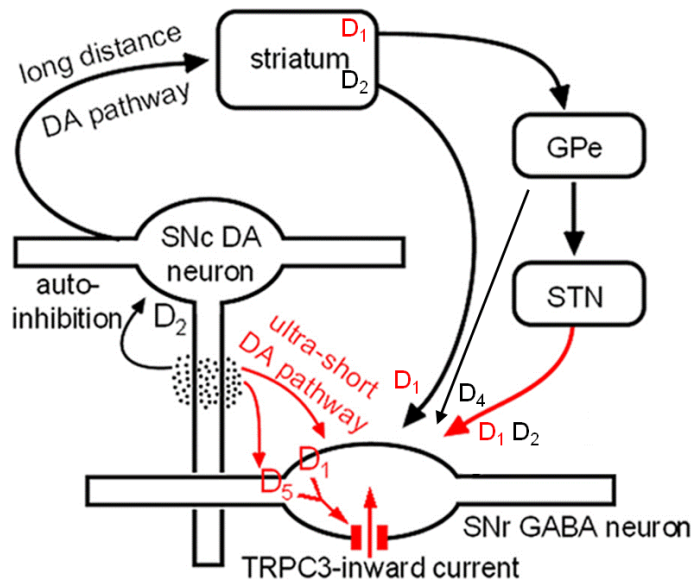


Figure 11 : La dopamine régule l'activité neuronale nigrale à différents niveaux. L'activité neuronale de la SNr est augmentée par l'action de la dopamine sur les récepteurs de type D1 au niveau pré-synaptique des terminaisons subthalamo-nigrales et sur les récepteurs de type D1 et D5 au niveau post-synaptique de la voie « ultra short ». A l'inverse, la dopamine diminue l'activité de la SNr en activant les récepteurs de type D1 situés sur les neurones du striatum de la voie indirecte et au niveau pré-synaptique de la voie striato-nigrale. Elle diminue également l'activité de la SNr en activant les récepteurs de type D2 de la voie directe, au niveau pré-synaptique de la voie subthalamo-nigrale et les récepteurs de type D4 de la voie pallido-nigrale. Modifié d'après Zhou et al., 2009.

Au niveau de la SNr, comme de l'ensemble des GB, la dopamine occupe donc une fonction primordiale. La SNc étant elle-même sujette à des régulations de son activité neuronale (voir § I.2.4), cela suggère que la transmission dopaminergique est un mécanisme complexe et finement régulé. Dès lors, la moindre perturbation peut faire effet « boule de neige » et aboutir à des dysfonctionnements de l'ensemble des GB pouvant mener à diverses pathologies, liées à une hyper- ou une hypodopaminergie. Ces perturbations sont traduites, entre autres, par des modifications de l'activité neuronale de la SNr que je détaillerai par la suite.

I.3.4. L'adénosine

L'adénosine est un nucléoside endogène qui exerce une action neuromodulatrice. L'adénosine extracellulaire peut provenir d'une libération par des transporteurs de l'adénosine ou de la dégradation, par des ecto-nucléotidases, de l'ATP libéré principalement par les astrocytes (Dunwiddie and Masino, 2001; Boison et al., 2010). Son action s'effectue par le biais de récepteurs métabotropiques de 4 types différents (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3). De la même façon que la dopamine, l'adénosine exerce deux effets opposés en fonction du type de récepteur activé.

Les récepteurs de type A_1 sont les récepteurs de l'adénosine les plus représentés dans le cerveau. Ils sont couplés à une protéine de type $G_{i/o}$ dont l'activation inhibe la formation d'AMPc, active

des canaux potassiques et inhibe des canaux calciques. Ainsi, les récepteurs de type A_1 sont responsables d'une inhibition de la transmission au niveau pré- comme post-synaptique (Ralevic and Burnstock, 1998). Les récepteurs de type A_{2A} ont fait l'objet de nombreuses études au sein des GB, en raison des fonctions importantes qu'ils remplissent et des interactions entretenues avec les récepteurs dopaminergiques que nous détaillerons un peu plus loin (Ferre et al., 1997; Xu et al., 2005; Ferre et al., 2007). Les récepteurs de type A_{2A} sont couplés aux protéines G_s , G_q ou G_{12} , responsables de l'activation de l'adénylate cyclase et de la protéine kinase C. L'activation des récepteurs de type A_{2A} entraîne donc une augmentation de la transmission synaptique (Ralevic and Burnstock, 1998).

Les récepteurs de type A_1 présentant une forte affinité pour l'adénosine (K_i : 70 nM pour les récepteurs de type A_1 et 150 nM pour les récepteurs de type A_{2A}), ils sont activés en premier lieu lors de libération tonique d'ATP (libéré par les astrocytes) conduisant à une régulation tonique de la transmission synaptique par l'adénosine (figure 12A). A l'inverse, lorsque de grandes quantités d'ATP sont libérées (provenant alors préférentiellement des neurones), les récepteurs de type A_{2A} sont également activés, conduisant à une augmentation de la transmission synaptique (Cunha, 2008). De plus, la stimulation des récepteurs de type A_{2A} diminue l'effet de la stimulation des récepteurs de type A_1 , contribuant ainsi à la potentialisation de la transmission synaptique (figure 12B). En parallèle, l'augmentation de cette transmission synaptique peut aboutir à une activation des astrocytes. Comme nous le verrons dans un prochain chapitre, les astrocytes ont la particularité de former un syncytium qui, lorsqu'ils sont activés, leur permet de communiquer sur de longues distances *via* la propagation d'informations calciques. Ainsi, dans les conditions décrites précédemment, l'activation des astrocytes peut entraîner une libération d'ATP au niveau d'une autre synapse, qui permettra d'activer des récepteurs de type A_1 (figure 12B). En résumé, l'adénosine peut exercer une action autocrine ou paracrine selon le type de récepteur activé et peut, *via* l'intervention des astrocytes, diminuer la transmission de façon hétéro-synaptique (Cunha, 2008).

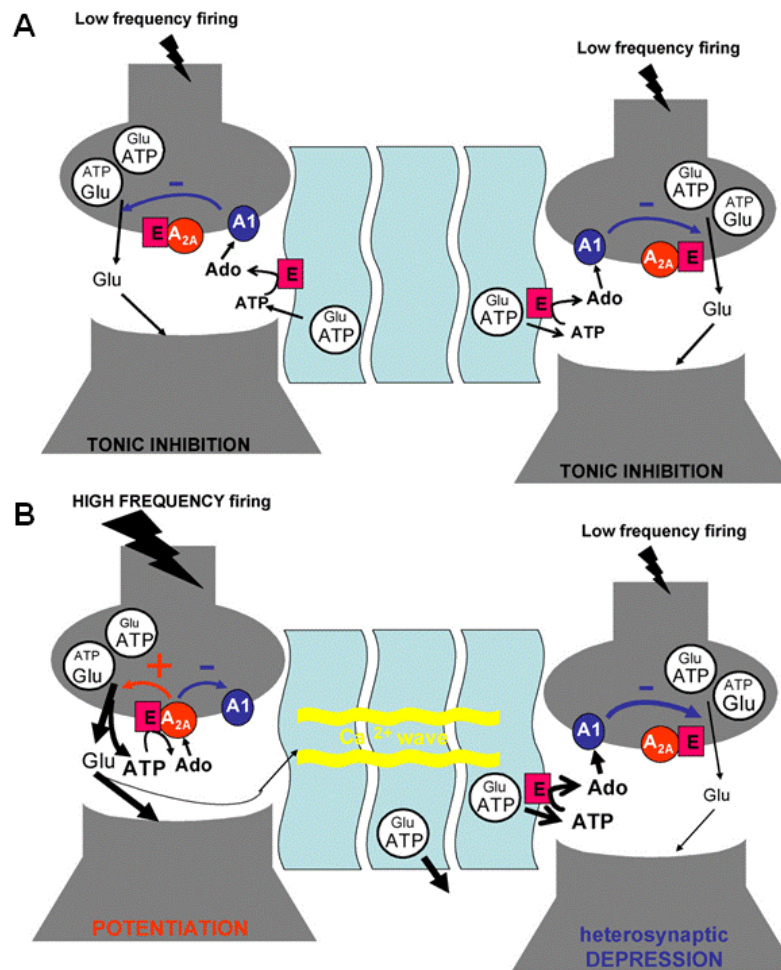


Figure 12 : Schéma de la régulation de la transmission synaptique par l'adénosine via les récepteurs de type A_1 et A_{2A} . A. En conditions basales, les astrocytes libèrent de l'ATP, transformé en adénosine par les ectonucléosidases. L'adénosine active alors les récepteurs de type A_1 et permet une diminution de la transmission synaptique. B. lorsque de grandes quantités d'ATP sont libérées par les neurones, l'adénosine active également les récepteurs de type A_{2A} . l'activation de ces récepteurs augmente la transmission synaptique tout en inhibant les récepteurs de type A_1 . En parallèle, l'adénosine induit une diminution de la transmission synaptique de façon hétérosynaptique, par le biais d'une communication inter-astrocytaire. D'après Cunha, 2008.

Le rôle de l'adénosine est d'autant plus complexe que celle-ci entretient d'étroites interactions avec la dopamine. En effet, les récepteurs de la dopamine et de l'adénosine forment des hétéromères responsables d'interactions inter-membranaires [pour revue voir (Ferre et al., 2007)]. Ce mécanisme est relativement bien décrit au niveau du striatum où les récepteurs de type D1 sont associés aux récepteurs de type A_1 au niveau des neurones de la voie directe, et les récepteurs de type D2 aux récepteurs de type A_{2A} au niveau de la voie indirecte. La formation de ces complexes permet à l'adénosine de diminuer l'affinité de la dopamine pour ses récepteurs et d'exercer ainsi des effets antagonistes à ceux de la dopamine (Ferre et al., 1997; Ferre et al., 2007).

Au niveau de la SNr, plusieurs études s'accordent sur la présence de récepteurs de type A₁ au niveau des terminaisons striato-nigrales. Leur activation engendre une diminution de la transmission GABAergique (Ferre et al., 1997; Shen and Johnson, 1997; Romo-Parra et al., 2009). Cette diminution ne serait pas due à une action directe de l'adénosine sur la transmission mais à un effet antagoniste des récepteurs de type D1 (Floran et al., 2002). La présence de récepteurs de type A₁ au niveau pré-synaptique des terminaisons subthalamo-nigrales a également été mise en évidence par Ke-Zhong Shen et Steven W. Johnson (1997), mais celle-ci reste controversée car une application *in vivo* d'antagonistes de ces récepteurs ne modifie pas les taux de glutamate extracellulaire dans la SNr (Ochi et al., 2004). Concernant la présence des récepteurs de type A_{2A}, il semblerait que la SNr en soit totalement dépourvue chez le rat mais pas le chez primate (Bogenpohl et al., 2011).

II.3.5. Les endocannabinoïdes

Le système endocannabinoïde (eCB) est un système ubiquitaire qui module différentes fonctions au niveau du système nerveux, du système immunitaire ou de la circulation sanguine. Les eCB sont des dérivés d'acides gras polyinsaturés dont les principaux représentants sont le N-arachidonylethanolamide (anadamide, AEA) et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG) [pour revue voir (Ahn et al., 2008)]. Les récepteurs des eCB sont des récepteurs métabotropiques dont il existe deux sous-types différents. Les récepteurs de type CB1 (pour « Cannabinoid Receptor 1 ») sont situés au niveau pré-synaptique et sont couplés à différentes voies de signalisation (conduisant à l'inhibition de l'adénylate cyclase, de canaux calciques dépendants du voltage ou à l'activation de canaux potassiques). Ils sont retrouvés dans tout l'organisme mais principalement au niveau du système nerveux central et périphérique. Les récepteurs de type CB2 (pour « Cannabinoid Receptor 2 ») sont principalement exprimés au niveau des cellules immunitaires (Freund et al., 2003). La synthèse d'eCB diffère de celle des neurotransmetteurs classiques. En effet, les eCB ne sont pas stockés dans des vésicules mais sont produits « à la demande » par hydrolyse des lipides membranaires au niveau post-synaptique. Plus exactement, leur synthèse et leur libération sont permises par l'entrée de Ca²⁺ concomitante à une dépolarisation post-synaptique. Dès lors, les eCB agissent de manière rétrograde en diminuant la transmission synaptique, suite à l'intégration post-synaptique d'un potentiel d'action. Ce phénomène est qualifié de DSI (pour « Depolarization-induced Suppression of Inhibition ») ou de DSE (pour « Depolarisation-induced Suppression of Excitation ») [pour revue voir (Chevaleyre et al., 2006)].

Au niveau des GB, les eCB sont impliqués dans la régulation de la transmission GABAergique, glutamatergique et dopaminergique, ce qui leur confère des rôles primordiaux aussi bien en condition physiologique que pathologique (Fernandez-Ruiz et al., 2002). Au sein de ce réseau, la SNr s'avère être la structure présentant la plus forte densité de récepteurs de type CB1 (Herkenham et al., 1991). De plus, les deux types de neurones présents dans la SNr (*i.e.* GABAergiques et dopaminergiques) ont été décrits comme étant capables de libérer des eCB

(Yanovsky et al., 2003). D'autre part, l'activité « pace-maker » des neurones de la SNr semble être suffisante à la production d'eCB (Romo-Parra et al., 2009) ce qui sous-entend une libération tonique d'eCB. La majeure partie des récepteurs de type CB1 est localisée au niveau des terminaisons striato-nigrales où leur activation conduit à une diminution de la transmission GABAergique (Tersigni and Rosenberg, 1996; Chan et al., 1998; Wallmichrath and Szabo, 2002; Matyas et al., 2006). Cependant, une action au niveau pré-synaptique des terminaisons excitatrices subthalamo-nigrales a également été décrite (Sanudo-Pena and Walker, 1997; Szabo et al., 2000).

Au niveau des terminaisons striato-nigrales, l'action médiée par les récepteurs de type CB1 s'oppose donc à celle résultant de l'activation des récepteurs de type D1. Plus exactement, les eCB permettent la mise en place d'une dépression synaptique alors que la dopamine permet une facilitation de ces synapses (Yanovsky et al., 2003; Aceves et al., 2011). Il semblerait que ces deux neuromodulateurs agissent selon un mode de synergie négative en fonction de l'activité des récepteurs NMDA (Aceves et al., 2011). En effet, lorsque les récepteurs NMDA sont inactifs, la dopamine engendre une facilitation des synapses striato-nigrales. A l'inverse, l'augmentation de calcium intracellulaire résultant de l'activation des récepteurs NMDA, induit une libération d'eCB, responsable d'une dépression synaptique striato-nigrale (figure 13) (Aceves et al., 2011).

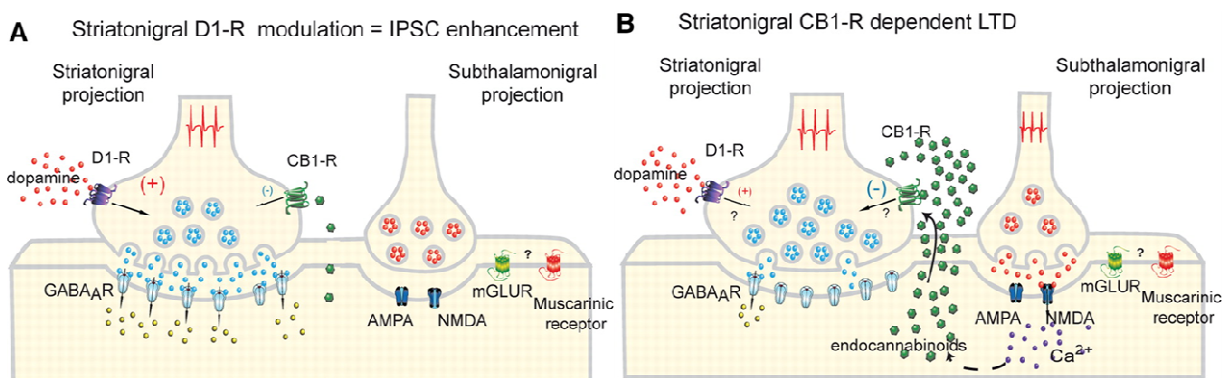


Figure 13 : La plasticité des synapses striato-nigrales induite par les eCB ou par la dopamine dépend de l'activation des récepteurs NMDA. (A) La dopamine entraîne une facilitation des synapses striato-nigrales via l'activation des récepteurs de type D1 lorsque les récepteurs NMDA sont inactifs. (B) L'activation des récepteurs NMDA permet la libération d'eCB dont l'action sur les récepteurs de type CB1 engendre une dépression synaptique des synapses striato-nigrales. D'après Aceves et al., 2011.

Au sein de la SNr, les eCB apportent un niveau de régulation supplémentaire. De plus, l'expression des récepteurs de type CB1 étant très importante dans cette structure (Herkenham et al., 1991) cela suggère un rôle important pour ces neuromodulateurs. Enfin, les eCB étant souvent reconnus comme étant des acteurs majeurs dans les phénomènes de plasticité

synaptique, cela pose la question de leur intervention dans de tels mécanismes au niveau de la SNr.

La SNr est également soumise à des régulations provenant d'autres structures que celles appartenant au réseau des GB. Bien que moins décrites dans la littérature, ces régulations n'en demeurent pas moins importantes et induisent un niveau de complexité supplémentaire que je vais aborder succinctement à présent.

II.3.6. La sérotonine

Au niveau du système nerveux central, le système sérotoninergique est impliqué dans la régulation de différentes fonctions (rythmes circadiens, appétit, température corporelle, douleur, humeur, anxiété). La sérotonine (5-hydroxy-tryptamine, 5-HT) provient de l'hydroxylation du tryptophane, un acide aminé essentiel (Jacobs and Azmitia, 1992). L'innervation sérotoninergique du système nerveux central provient majoritairement du noyau du raphé, dont l'activité « pace-maker » permet une libération tonique de sérotonine (Dahlstrom and Fuxe, 1964; Jacobs and Azmitia, 1992). La 5-HT agit sur différentes familles de récepteurs, regroupés en 7 classes (5-HT₁ à 7). Hormis le récepteur de type 5-HT₃ qui appartient aux récepteurs ionotropiques, les récepteurs de la sérotonine sont de nature métabotrope. Les récepteurs de type 5-HT_{1A} inhibent l'adénylate cyclase, les récepteurs de type 5-HT₂ activent la PLC et les récepteurs de types 5-HT_{4/5/6/7} activent l'adénylate cyclase (Barnes and Sharp, 1999).

Au niveau de la SNr, la sérotonine agit aux niveaux pré- et post-synaptique en générant une activation globale de l'activité neuronale nigrale. Les récepteurs de type 5-HT_{1B} localisés au niveau pré-synaptique des synapses striato-nigrales et nigro-nigrales entraînent une diminution de la transmission GABAergique (Stanford and Lacey, 1996). En parallèle, les récepteurs de type 5-HT_{2C} situés au niveau post-synaptique engendrent une dépolarisation des neurones nigraux conduisant à une activation de ceux-ci (Rick et al., 1995; Stanford and Lacey, 1996; Invernizzi et al., 2007). La présence d'autres types de récepteurs 5-HT a également été décrite (notamment 5-HT_{2A} et 5-HT₄), cependant les taux d'expression semblent être très faibles (Cornea-Hebert et al., 1999; Vilaro et al., 2005).

II.3.7. L'acétylcholine

L'acétylcholine (ACh) est un neuromédiateur ubiquitaire impliqué dans de nombreux processus physiologiques essentiels. Les synapses cholinergiques sont présentes aussi bien dans le système nerveux central qu'au niveau de la jonction neuromusculaire. L'ACh exerce son effet par le biais de récepteurs ionotropiques (les récepteurs nicotiniques) ou métabotrope (les récepteurs muscariniques) qui tirent leur nom de leur agoniste respectif. Les récepteurs nicotiniques (nAChR) sont formés par l'assemblage de 5 sous-unités (dont il existe 17 formes : $\alpha 1$ à 10, $\beta 1$ à 4, γ , δ et ϵ) et peuvent exister sous forme homo- ou hétéro-mérique (Morley, 1981). Les nAChRs

sont perméables aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} et leur activation est responsable d'une dépolarisation membranaire. Les récepteurs muscariniques (mAChR) sont de deux types, en fonction du type de protéine G à laquelle ils sont couplés. Les mAChRs 1,3 et 5 sont couplés à une protéine G_q responsable de l'activation de la PLC aboutissant au final à une dépolarisation membranaire. Les mAChR 2 et 4 sont couplés à une protéine G_i qui inhibe l'adénylate cyclase et aboutit à une hyperpolarisation (Birdsall and Hulme, 1976).

L'ACh de la SNr provient majoritairement du PPN (Saper and Loewy, 1982; Lee and Tepper, 2009) et exerce son effet sur les nAChRs et mAChRs, tous deux décrits au niveau de la SNr (Nastuk and Graybiel, 1991; Klink et al., 2001; Wooltorton et al., 2003; Michel et al., 2004; Poisik et al., 2008). L'action de l'ACh sur la SNr est de nature excitatrice. Cet effet a été étudié *in vitro* et implique l'activation des nAChRs (Nashmi et al., 2007) et des mAChRs (Klink et al., 2001; Wooltorton et al., 2003; Michel et al., 2004; Poisik et al., 2008). Une activation des neurones de la SNr a également été montrée *in vivo* par application d'ACh ou suite à la stimulation du PPN (Collingridge and Davies, 1981; Pinnock and Dray, 1982; Scarnati et al., 1984; Scarnati et al., 1987).

II.3.8. L'histamine

L'histamine du système nerveux central est produite exclusivement au niveau du noyau tuberomamillaire du thalamus, qui innerve pratiquement tout le cerveau [pour revue voir (Brown et al., 2001b)], dont la SNr (Panula et al., 1989), en libérant l'histamine de façon tonique (Zhou et al., 2006). Les récepteurs de l'histamine sont métabotropiques et sont classés en trois groupes: les récepteurs de type H1 (couplés positivement à la PLC), les récepteurs de type H2 (couplés positivement à l'adénylate cyclase) et les récepteurs de type H3 (couplés négativement à l'adénylate cyclase) (Brown et al., 2001b).

Au sein de la SNr, les effets de l'histamine sont divers et s'exercent essentiellement au niveau post-synaptique. Les trois types de récepteurs étant présents, l'action de l'histamine peut engendrer une dépolarisation ou une hyperpolarisation des neurones nigraux (Zhou et al., 2006).

A l'instar de l'adénosine, l'histamine peut entretenir des relations avec d'autres neurotransmetteurs, comme la dopamine et la sérotonine. L'activation des récepteurs de type H3 au niveau des terminaisons striato-nigrales engendre, par exemple, une diminution de la transmission GABAergique par une action antagoniste des récepteurs de type D1 (Garcia et al., 1997). Au niveau des terminaisons raphé-nigrales, l'activation des récepteurs H3 entraîne une diminution de la libération de sérotonine dans la SNr (Threlfell et al., 2004).

II.3.9. La glycine et la taurine

La glycine est, après le GABA, le second neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux. Elle induit une hyperpolarisation membranaire *via* l'action de récepteurs ionotropiques couplés à une

conductance chlorure [pour revue voir (Legendre, 2001)]. Les récepteurs glycinergiques peuvent également être activés par la taurine, un autre acide aminé essentiel. Enfin, la glycine sert de co-agoniste des récepteurs NMDA [pour revue voir (Bonaccorso et al., 2011)].

Concernant la SNr, la taurine serait libérée par les afférences striato-nigrales, alors que la glycine aurait une origine gliale (Bianchi et al., 1998; Dopico et al., 2006). Les études concernant le rôle des récepteurs glycinergiques dans la SNr sont peu nombreuses. L'activation des récepteurs glycinergiques par la taurine ou la glycine a été montrée comme étant responsable d'une inhibition de l'activité neuronale (Dray et al., 1976; Ye et al., 1997).

Pour résumer cette partie, la SNr est le siège de nombreuses régulations. Tout d'abord au niveau intrinsèque, où l'activité neuronale est sous contrôle de conductances particulières résultant de l'expression des différents canaux ioniques. Les nombreuses afférences de la SNr ajoutent alors un niveau de régulation supplémentaire. La diversité de ces régulations, ainsi que les interactions qu'elles peuvent entretenir, sont donc à l'origine d'une régulation extrêmement fine et complexe de l'activité neuronale de la SNr. Cette activité étant responsable de la transmission des informations entre les GB et le cortex, les régulations décrites ci-dessus occupent donc une place primordiale. Nous verrons que certaines perturbations du réseau des GB s'accompagnent de modifications de l'activité de la SNr. Ces modifications perturbent la transmission des informations vers le cortex et sont caractéristiques de certaines pathologies, comme la maladie de Parkinson. Dans la prochaine partie, nous nous intéresserons donc aux modifications de l'activité neuronale qui accompagnent cette pathologie. Nous verrons tout d'abord quelles sont les causes de cette maladie et quelles en sont les conséquences au niveau des différents noyaux des GB. Nous détaillerons notamment les perturbations retrouvées au sein de la SNr. Enfin, nous discuterons des différentes thérapeutiques de la maladie de Parkinson et notamment de la stimulation à haute fréquence du NST. Nous discuterons des effets de cette stimulation au niveau local puis plus précisément, au niveau de la SNr.

III Dysfonctionnement du réseau des ganglions de la base : cas de la maladie de Parkinson

III.1. La maladie de Parkinson

III.1.1. Généralités

La maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative dont la prévalence est de 1.5 à 2% chez les personnes de plus de 65 ans (Tison et al., 1994). Dans la majorité des cas, l'affection est sporadique mais il existe des formes familiales (10 à 15% des cas). La MP reste idiopathique même s'il existe certaines hypothèses mettant en avant des facteurs génétiques ou environnementaux (métaux lourds, pesticides, herbicides) [pour revue voir (Kumar et al., 2011)]. Cette pathologie résulte de la dégénérescence des neurones dopaminergiques du mésencéphale et se caractérise au niveau intracellulaire par la présence de corps de Lewy. Les corps de Lewy sont des inclusions retrouvées au niveau du soma et parfois de l'axone. Ils sont constitués d'agrégats de protéines comme l' α -synucléine (Spillantini et al., 1997). Les mécanismes possibles de la dégénérescence sont nombreux. On peut citer l'augmentation du niveau de fer, celui de la monoamine oxydase, le stress oxydatif, le déficit énergétique, des phénomènes inflammatoires, l'excitotoxicité du glutamate, la synthèse d'oxyde nitrique, la conformation et l'agrégation anormales de protéines, la diminution de l'expression de facteurs trophiques ou encore des anomalies de la régulation calcique (Dauer and Przedborski, 2003; Mandel et al., 2003).

D'un point de vue clinique, la MP se manifeste par divers symptômes dont les plus caractéristiques restent les symptômes moteurs, à savoir le tremblement de repos, la bradykinésie (voire l'akynésie) et l'hypertonie. Cependant, d'autres symptômes non moteurs s'ajoutent au tableau clinique et peuvent être très invalidants (des troubles végétatifs comme des troubles du sommeil, du langage ou de la digestion, mais aussi des troubles cognitifs comme la dépression, l'anxiété ou l'apathie) [pour revue voir (Wolters, 2008)]. A l'heure actuelle, la MP n'est plus considérée comme étant une pathologie uniquement dopaminergique car elle s'étend à d'autres systèmes, comme les systèmes cholinergiques, noradrénergiques ou sérotoninergiques (Fornai et al., 2007; Huot et al., 2011; Yarnall et al., 2011). Dans cette partie, nous aborderons les différentes perturbations du réseau des GB retrouvées dans la MP. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux perturbations de l'activité neuronale de la SNr. Enfin, nous parlerons des thérapies actuelles de cette maladie, et plus précisément de la stimulation à haute fréquence du NST.

III.1.2. Conséquences sur le fonctionnement du réseau des GB

La dégénérescence des neurones dopaminergiques aboutit à de nombreuses perturbations du réseau des GB. D'une manière générale, cette pathologie se caractérise par une hyperactivité de la voie indirecte et une hypoactivité de la voie directe (Obeso et al., 2002). La résultante de ces modifications conduit à une hyperactivité glutamatergique, responsable d'une inhibition excessive du thalamus et du tronc cérébral (figure 14) (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Obeso et al., 1997; Obeso et al., 2002).

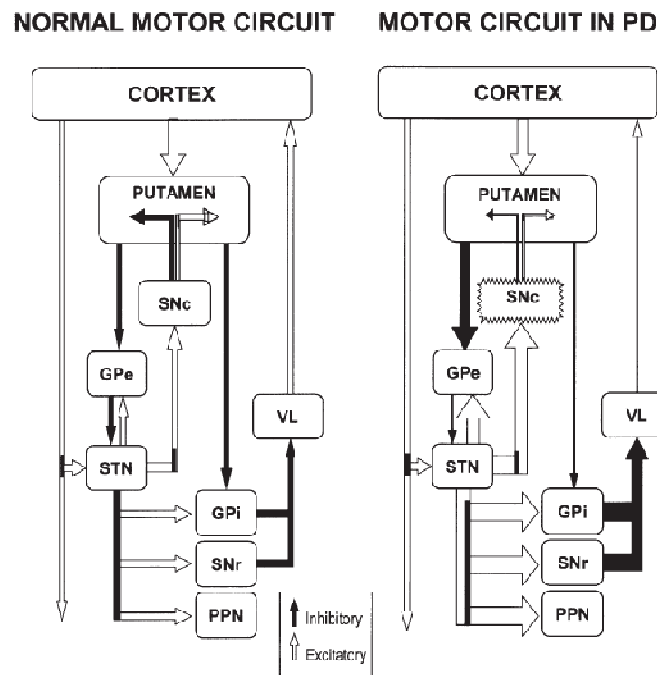


Figure 14 : La maladie de Parkinson se caractérise par une perturbation de l'activité du réseau des ganglions de la base. Schéma du réseau des GB en condition physiologique et d'hypodopaminergie. En condition physiologique, la dopamine active les neurones de la voie directe et inhibe ceux impliqués dans la voie indirecte. Le manque de dopamine mène à une augmentation de la transmission inhibitrice vers le GPe, responsable d'une désinhibition du NST, conduisant à une hyperactivité des structures de sorties. En parallèle, la transmission striato-nigrale est diminuée ce qui aboutit également à une augmentation de l'activité de la SNr et du GPi. GPe : globus pallidus externe. GPi : globus pallidus interne. PPN : noyau pedonculopontin. SNc : substantia nigra pars compacta. SNr : substantia nigra pars reticulata. STN : noyau sous-thalamique. VM : noyau ventro-médian du thalamus. D'après Obeso et al., 2002

Dans le § I.2.1, nous avons décrit la capacité des MSNs striataux de détecter les informations corticales pertinentes. Lors de la MP, l'hypodopaminergie perturbe la lecture des informations corticales par les MSNs. La durée durant laquelle les MSNs sont à l'état « up » est plus longue et la probabilité d'émission de potentiels d'action durant cet état est augmentée (Murer et al., 2002). Ces modifications engendrent des réponses inappropriées (figure 15), qui se répercutent alors dans tout le réseau des GB.

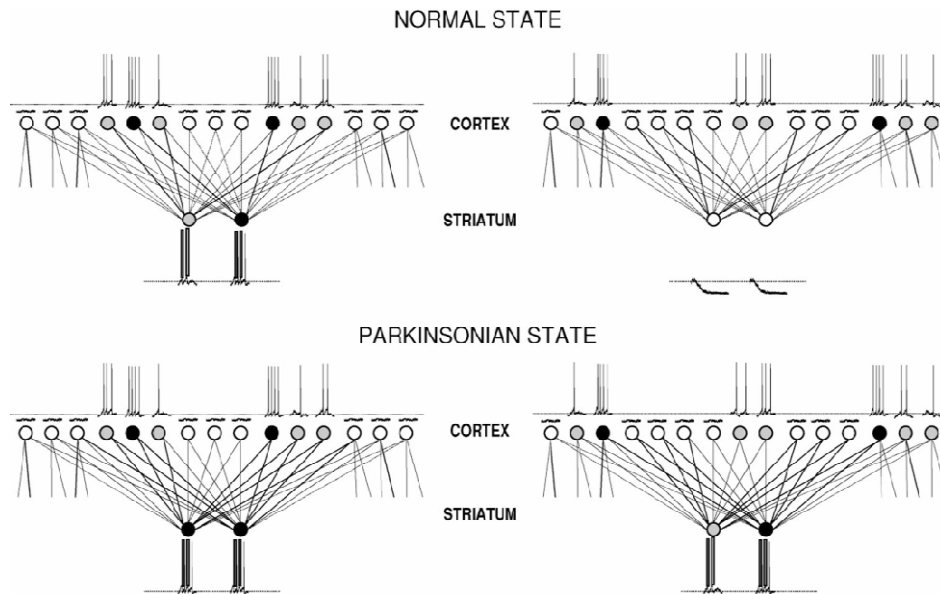


Figure 15 : La lecture des informations corticales par les MSNs est perturbée lors d'une lésion nigro-striatale. Schéma représentatif des relations cortico-striatales en condition physiologique et pathologique. En condition d'hypodopaminergie la réponse neuronale des MSNs à une stimulation corticale est plus forte (panel de gauche) et la probabilité d'activation de ces neurones est plus grande (panel de droite). D'après Murer et al., 2002.

Cependant, les perturbations de l'activité neuronale ne se limitent pas aux MSNs car les récepteurs dopaminergiques sont distribués dans tout le réseau des GB. Ainsi, le manque de dopamine engendre des perturbations locales au niveau de chacun des noyaux des GB, qui se répercutent sur tout le réseau en raison des interactions entretenues entre les différents noyaux. L'une des principales modifications de l'activité des GB est la modification de la fréquence et du patron de décharge neuronale des noyaux présentant une activité « pace-maker » (Wichmann and DeLong, 2006). Au niveau du GPe, la fréquence de décharge des neurones GABAergiques est diminuée. En parallèle, l'activation inappropriée des MSNs par les neurones corticaux, entraîne une sur-inhibition de ces neurones pallidaux (Chan et al., 2011). Au niveau du NST, la fréquence de décharge des neurones glutamatergiques est largement augmentée (Bergman et al., 1994; Hassani et al., 1996). La modification de la fréquence s'accompagne surtout d'une modification du patron de décharge. En effet, les neurones du NST adoptent un mode de décharge en « bursts » pouvant se manifester de façon irrégulière ou rythmique (Ni et al., 2001; Bevan et al., 2002a; Sharott et al., 2005). De plus, les interactions réciproques entretenues avec le GPe entraînent ces deux noyaux dans un mode de décharge en bouffées synchrones (Brown et al., 2001a). Enfin, la MP est caractérisée par une augmentation des oscillations, principalement dans la bande de fréquence bêta (15 à 30 Hz) (figure 16A et B). On entend par oscillation, la capacité des neurones à émettre des potentiels d'action en phase avec une période définie. Ces oscillations sont retrouvées au sein d'une même structure mais également entre différents noyaux, et sont alors responsables de synchronies. Les oscillations sont présentes à l'état

physiologique mais sont plus fréquentes dans la maladie de Parkinson où elles sont retrouvées dans tous les noyaux et présentent un certain degré de cohérence entre les différentes structures (figure 16C) (Brown, 2003; Gatev et al., 2006; Wichmann and DeLong, 2006; Hammond et al., 2007; Dejean et al., 2008; Weinberger et al., 2009).

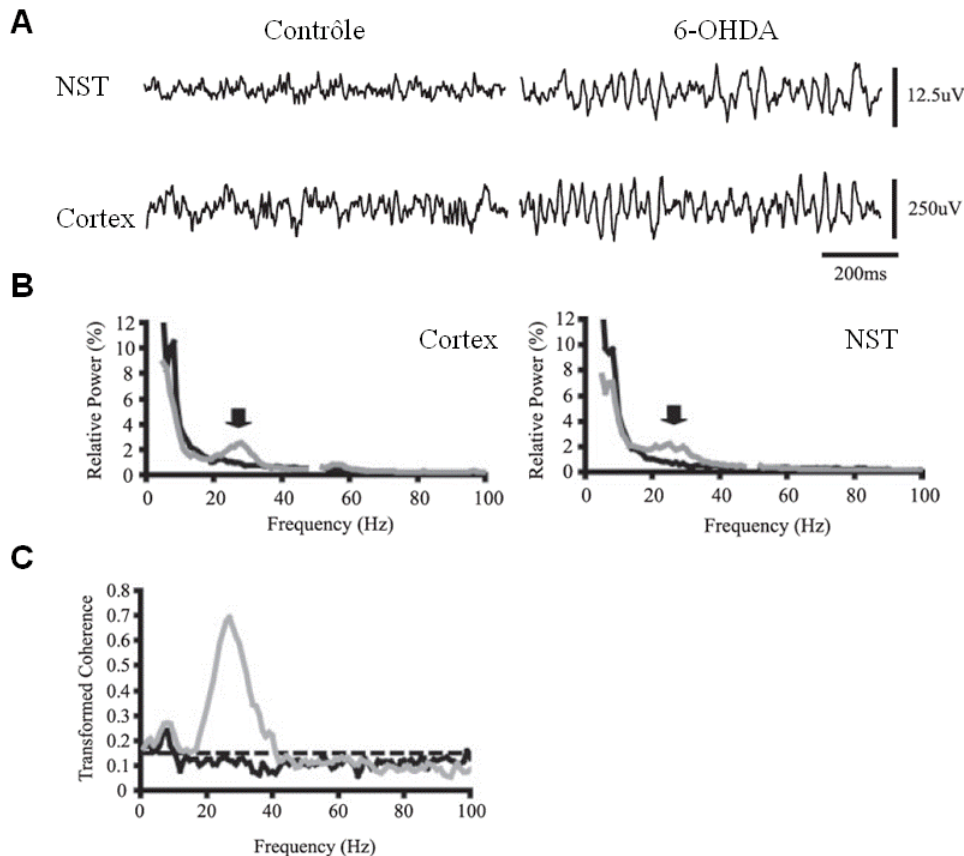


Figure 16 : La puissance et la cohérence des activités neuronales dans la bande de fréquence bêta dans le cortex et le NST sont augmentées en condition d'hypodopaminergie. A. Exemples d'enregistrements en potentiels de champ locaux dans le NST et le cortex, chez un rat sain ou lésé à la 6-OHDA. B. Spectre de puissance moyennée dans les différentes fréquences correspondant aux enregistrements en A (animal sain en noir et lésé en gris). Les activités dans la bande de fréquence bêta sont augmentées dans les deux structures. C. Spectre de cohérence entre le cortex et le NST. Le NST et le cortex présentent une forte cohérence de leur activité en condition hypodopaminergique (animal sain en noir et lésé en gris). D'après Sharott et al., 2005.

En résumé, les perturbations liées à la MP reposent sur deux théories regroupées sous le terme de « rate model » ou de « oscillatory model ». La première met en avant la perturbation de l'équilibre entre les voies directe et indirecte. La seconde stipule que les perturbations du réseau sont dues à l'apparition de décharges en bouffées et d'oscillations synchrones entre les différents noyaux des GB (Ibanez-Sandoval et al., 2007). Cependant, ces modèles ne sont pas incompatibles et sont probablement retrouvés de manière simultanée.

III.1.3. Conséquences sur le fonctionnement de la substance noire réticulée

A l'instar des autres structures des GB, la SNr est le siège de perturbations de son activité neuronale en situation d'hypodopaminergie. La SNr étant la structure de sortie des GB, les différentes perturbations de l'activité du réseau se répercutent sur celle-ci et génèrent une hyperactivité des neurones nigraux (Obeso et al., 2002). En parallèle, l'hypodopaminergie est à l'origine de certaines perturbations plus locales. En effet, dans le § II.3.3 nous avons décrit la présence, au niveau pré-synaptique, de récepteurs dopaminergiques de type D1 sur les terminaisons striato-nigrales, de type D2 sur les pallido-nigrales et de type D1 et D4 sur les subthalamo-nigrales. Ainsi, le manque de dopamine aboutit à une diminution de la transmission striato-nigrale, une augmentation de la transmission pallido-nigrale et une augmentation de la transmission subthalamo-nigrale (Ibanez-Sandoval et al., 2006; Aceves et al., 2011).

Les modifications de la fréquence et du patron de décharge neuronale, décrites dans les autres noyaux des GB, sont également retrouvées au niveau de la SNr. Ainsi, la maladie de Parkinson s'accompagne d'une augmentation de la fréquence de décharge neuronale et de l'émission de potentiels d'action en bouffées, mises en évidence chez le rat (Burbaud et al., 1995), le primate (Wichmann et al., 1999) ou encore en tranches suite à l'application d'antagonistes dopaminergiques (figure 17) (Ibanez-Sandoval et al., 2007; Aceves et al., 2011).

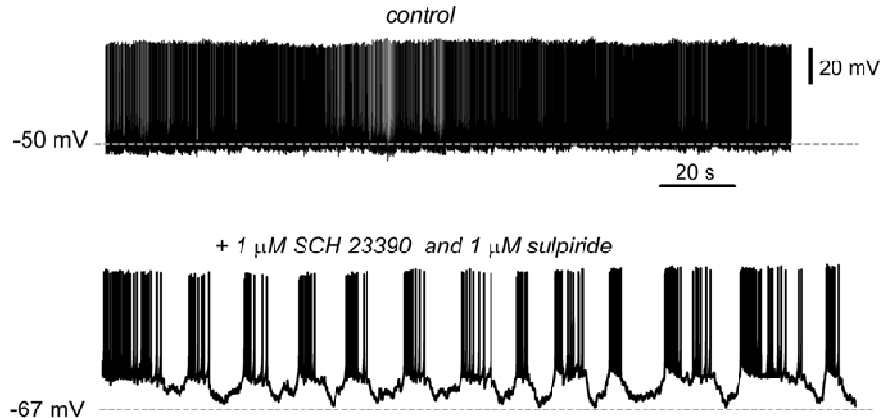


Figure 17 : Le blocage des récepteurs dopaminergiques modifie le patron de décharge des neurones de la SNr. Enregistrement électrophysiologique en tranche de cerveaux de rat de la décharge spontanée des neurones de la SNr en condition contrôle ou lors d'application d'antagonistes des récepteurs, de types D1 (SCH 23390) et D2 (sulpiride). L'application d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques s'accompagne de l'apparition de décharges en bouffées, selon un mode oscillatoire. D'après Aceves et al., 2011.

Ce mode de décharge en « bursts » est retrouvé en condition physiologique mais ne concerne que très peu de neurones. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, les neurones de la SNr possèdent les propriétés électrophysiologiques permettant la mise en place d'un plateau de potentiel responsable de la décharge en bouffée, à l'image des neurones du NST (§ II.2.2). Les

potentiels d'action « intra burst » font ensuite intervenir différents types de canaux, comme les canaux HCN (Hyperpolarization-activated cation channels) ou des canaux potassiques activés par le calcium (Ibanez-Sandoval et al., 2007).

Enfin, en conditions d'hypodopaminergie, une augmentation des oscillations dans la bande de fréquence bêta a été mise en évidence dans la SNr. Chez le rat, il a été montré que cette augmentation concernait les bandes de basses fréquences bêta (12 à 25 Hz) au repos, et les hautes fréquences bêta (25 à 40 Hz) lors du mouvement (Avila et al., 2009).

III.2. Thérapie de la maladie de Parkinson par stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique

III.2.1. Généralités sur les différentes thérapeutiques de la maladie de Parkinson

Les traitements actuels de la MP permettent d'améliorer la qualité de vie des patients mais restent symptomatiques et n'empêchent pas la progression de la dégénérescence neuronale. Les traitements pharmacologiques se sont avérés très efficaces et ont connu une avancée majeure depuis leur mise en place dans les années 1960 (Cotzias et al., 1969). Le traitement médicamenteux initial consistait en la prise de L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), un précurseur de la dopamine capable de passer la barrière hémato-encéphalique. La L-DOPA est alors transformée en dopamine par la DOPA décarboxylase. Cependant, la prise de L-DOPA s'accompagne au long cours, de l'apparition de complications motrices très invalidantes (appelées dyskinésies) (Fabbrini et al., 2007). Pour pallier ce problème, d'autres agents pharmacologiques ont été commercialisés afin de pouvoir retarder au maximum la prise de L-DOPA. Ces agents sont divers et comprennent des agonistes dopaminergiques (principalement spécifiques des récepteurs de type D2), des inhibiteurs de la recapture de la dopamine ou encore des agents non dopaminergiques (cholinergiques, adrénergiques, sérotoninergiques ou glutamatergiques) [pour revue voir (Gardian and Vecsei, 2010)].

Les complications motrices liées à la prise de L-DOPA ont également pu être améliorées par l'utilisation d'une autre thérapeutique de la MP, de nature neurochirurgicale. Cette approche a débuté de façon empirique, avant l'ère de la L-DOPA, et consistait en la lésion de différents noyaux des GB. Depuis la fin des années 80, le traitement neurochirurgical s'avère être une bonne alternative à la prise de L-DOPA et consiste en la stimulation cérébrale profonde de noyaux des GB (Walter and Vitek, 2004). La première cible de la stimulation a été le noyau ventro-médian du thalamus (Benabid et al., 1987). A l'heure actuelle, le traitement chirurgical de référence de la MP consiste en la stimulation à haute fréquence (SHF) du NST. Le choix de cette cible s'est appuyé sur des études réalisées chez le singe, montrant l'amélioration des symptômes

parkinsoniens après lésion ou stimulation du NST (Bergman et al., 1990; Aziz et al., 1991; Benazzouz et al., 1993). Chez l'homme, la première intervention chirurgicale de SHF du NST a été réalisée à Grenoble, il y a presque 20 ans (Pollak et al., 1993). La SHF du NST améliore les symptômes moteurs de la MP (Limousin et al., 1995a; Limousin et al., 1995b; Pollak et al., 1996; Thobois et al., 2002; Krack et al., 2003) et permet de réduire voire de supprimer les doses de médicaments (L-DOPA et agonistes dopaminergiques), limitant ainsi les dyskinésies (Krack et al., 1997).

A l'heure actuelle, la SHF est utilisée dans le traitement d'autres pathologies comme les épilepsies (Fisher et al., 2010), la dépression (Andrade et al., 2010), la douleur (Levy et al., 2010), le syndrome de Gilles de la Tourette (Visser-Vandewalle et al., 2003) ou encore les troubles obsessionnels compulsifs (Mallet et al., 2002).

En dépit de ses effets bénéfiques, et malgré le fait que cette technique soit utilisée depuis une trentaine d'années, les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents sont encore débattus (Kringelbach et al., 2007). Nous allons à présent décrire les différents effets de la SHF du NST tout d'abord au niveau local c'est à dire au niveau du NST. Par la suite, nous nous focaliserons sur l'impact de cette stimulation sur l'activité neuronale de la SNr.

III.2.2. Mécanismes cellulaires à l'origine de l'efficacité de la stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique

III.2.2.a : Mécanismes locaux de la SHF du NST : effets sur les neurones du NST.

Il existe différentes hypothèses concernant les mécanismes de la SHF du NST [pour revue voir (Garcia et al., 2005; Deniau et al., 2010)]. En raison des similitudes entre les effets cliniques de la SHF du NST et de sa lésion chez le primate, la première hypothèse a été que la stimulation inhibait le NST (Aziz et al., 1991; Guridi et al., 1994). Cette hypothèse a été corroborée par des études montrant l'inhibition de l'activité neuronale du NST suite à sa stimulation, *in vitro* chez l'animal (Beurrier et al., 2001; Magarinos-Ascone et al., 2002; Tai et al., 2003) et chez le patient (Filali et al., 2004; Welter et al., 2004).

A l'inverse, plusieurs études ont mis en évidence que la SHF active le NST. Dans ce sens, il a été montré que les neurones du NST sont activés par la SHF (Lee et al., 2003; Lee et al., 2004), tout comme les structures efférentes du noyau : le GPe, le GPi/EP et la SNr (Windels et al., 2000; Hashimoto et al., 2003; Windels et al., 2003; Kita et al., 2005).

Cependant la SHF du NST pourrait avoir des effets plus complexes, ne se limitant pas simplement à une inhibition ou une excitation du NST. Certaines études montrent, par exemple, que cette technique permet d'imposer un patron de décharge au sein du NST *in vitro* (Garcia et al., 2003; Garcia et al., 2005) ou chez l'homme (Rossi et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré

que la SHF du NST réduisait les oscillations de type bêta et les synchronies anormales caractéristiques de la MP (figure 18) (Hammond et al., 2007).

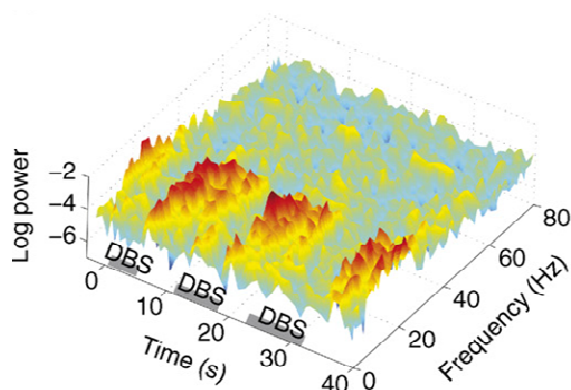


Figure 18: La stimulation à haute fréquence du NST réduit les oscillations dans la bande de fréquence bêta. Carte temps/fréquence obtenue après enregistrement en potentiels de champ locaux dans le GPi, chez un patient atteint de la maladie Parkinson et implanté dans le NST. Les enregistrements sont réalisés durant et entre trois périodes de stimulation à haute fréquence du NST. Les activités dans la bande de fréquence bêta sont diminuées par la SHF du NST. D'après Hammond et al., 2007.

L'étude de ces mécanismes reste cependant difficile à appréhender car de nombreux paramètres sont à prendre en compte. A un niveau neuronal par exemple, on sait que les axones des neurones du NST sont plus facilement excitables par la stimulation électrique que les corps cellulaires ou les dendrites, en raison de propriétés électriques différentes (Nowak and Bullier, 1998b, a). A un niveau plus intégré, ces propriétés électriques dépendent de la présence de différents types neuronaux et de cellules gliales, ainsi que de leur géométrie (diamètre et orientation des axones, forme des corps cellulaires, nombre de fibres de passages...) [pour revue voir (Kringelbach et al., 2007; Vedam-Mai et al., 2012)]. Enfin, les effets de la stimulation varient en fonctions des paramètres utilisés (amplitude, durée du stimulus et fréquence). Chez l'homme, les effets thérapeutiques bénéfiques de la stimulation sont décrits dans une échelle de 80 à 180 Hz et de 1 à 10 mA (Vedam-Mai et al., 2012). L'ensemble de ces caractéristiques sous-entend que la SHF du NST pourrait avoir différents effets au niveau de l'axone et du soma des neurones stimulés (McIntyre et al., 2004). Ce mécanisme pourrait mener à une inhibition de l'activité neuronale au sein du NST et une activation des fibres afférentes, efférentes ou passant à proximité du NST [pour revue voir (Kringelbach et al., 2007; Deniau et al., 2010)]. L'activation des fibres pallido-nigrales passant à proximité du NST a en effet été mise en évidence à la fois *in vitro* (Bosch et al., 2011) et *in vivo* (Windels et al., 2000; Maurice et al., 2003; Windels et al., 2003; Degos et al., 2005; Windels et al., 2005). Enfin, une étude utilisant la technique d'optogénétique *in vivo* chez le rat lésé à la 6 hydroxy-dopamine (6-OHDA), a montré que l'inhibition ou l'activation des neurones du NST n'était pas suffisante pour reverser les symptômes moteurs liés à l'hypodopaminergie, contrairement à la stimulation des fibres

afférentes cortico-NST (Gradinaru et al., 2009). Ces résultats suggèrent que les effets bénéfiques de la SHF du NST seraient plutôt sous-tendus par des effets à distance comprenant l'activation de fibres afférentes, efférentes et de passage.

III.2.2.b : Impact de la SHF du NST sur l'activité de la SNr.

Au niveau de la SNr, il a tout d'abord été montré que la SHF du NST induisait une diminution de l'activité neuronale chez le rat sain ou lésé à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Benazzouz et al., 1995; Benazzouz et al., 2000). Ces données sont en accord avec l'hypothèse d'une inhibition du NST par la stimulation électrique que nous avons décrit précédemment. Dans ce sens, il a également été montré qu'une lésion du NST induisait une inhibition de l'activité neuronale de la SNr (Burbaud et al., 1995) ou restaurait l'activité neuronale nigrale perturbée par une lésion à la 6-OHDA (Tseng et al., 2001).

Cependant, dans la partie précédente nous avons exposé le fait que la SHF du NST ne se limitait pas à une simple excitation ou inhibition des neurones du NST. Cela implique que les effets à distance, au niveau de la SNr, ne sont pas non plus restreints à une activation ou une inhibition neuronale. Plusieurs études ont en effet mis en avant un impact à la fois inhibiteur et excitateur de la SHF du NST sur l'activité de la SNr. Cette dualité d'effet est retrouvée en condition physiologique, de déplétion dopaminergique ou de blocage de la transmission dopaminergique. Chez le rat sain *in vivo*, Nicolas Maurice et collaborateurs (2003) ont montré que la SHF du NST peut induire une inhibition ou une activation des neurones de la SNr. Appliquée à faible intensité (inférieure à 4 V), la stimulation augmente la transmission GABAergique et donc, diminue l'activité neuronale nigrale (la libération de GABA pouvant provenir des collatérales d'axones des neurones nigraux ou de la voie pallido-nigrale). A plus forte intensité (5 à 10 V), la voie subthalamo-nigrale est activée, résultant en une excitation de la SNr (Maurice et al., 2003). En parallèle, des augmentations des contenus extracellulaires de glutamate et de GABA dans la SNr ont été mises en évidence durant la SHF du NST par des expériences de microdialyse (toujours chez le rat sain), *in vivo* (Windels et al., 2000; Windels et al., 2003; Boulet et al., 2006). Ces données sont confirmées par une étude plus récente réalisée en tranche aigue de cerveau de rat. Dans le § I.2.3, nous avons décrit qu'une stimulation unique du NST résultait en une réponse présentant à la fois une composante excitatrice et inhibitrice. Cette réponse est également retrouvée lors d'une stimulation à haute fréquence, appliquée durant 30 secondes (Bosch et al., 2011).

Lors d'une perturbation de la transmission dopaminergique (lésion à la 6-OHDA ou blocage des récepteurs dopaminergiques de type D1 et D2), il a été montré que la SHF du NST entraîne à la fois une excitation et une inhibition des neurones de la SNr et ce, *in vitro* (figure 19) (Bosch et al., 2011) comme *in vivo* (Degos et al., 2005). D'autre part, les taux de GABA et de glutamate extracellulaires dans la SNr ont également été mesurés en conditions d'hypodopaminergie chez

le rat *in vivo*. Dans ces conditions, la SHF induit une augmentation des taux de GABA extracellulaire. Concernant le glutamate, l'effet de la SHF est masqué par l'hyperactivité du NST (induite par la lésion). En effet, les taux de glutamate étant déjà maximum, il n'est pas possible de détecter d'éventuelles libérations supplémentaires induites par la stimulation du NST (Windels et al., 2005).

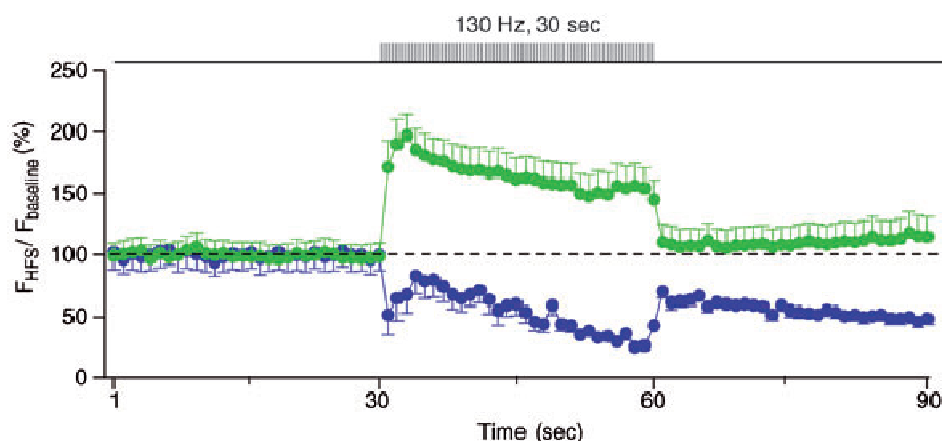


Figure 19 : La stimulation à haute fréquence du NST induit une excitation ou une inhibition des neurones de la SNr. Représentation des fréquences de décharge des neurones de la SNr enregistrées en tranches de cerveaux de rats lésés à la 6-OHDA, lors d'une stimulation à haute fréquence du NST. Les fréquences sont normalisées par rapport à celles enregistrées avant la stimulation. La SHF du NST induit une augmentation de la fréquence de décharge dans certains neurones et une diminution dans d'autres. D'après Bosh et al., 2011.

Enfin, ces effets ont également été décrits chez le patient implanté dans le NST, où certaines études mettent en évidence une excitation des neurones de la SNr (Galati et al., 2006), alors que d'autres rapportent une inhibition de ces neurones (Maltete et al., 2007).

En conclusion, la SHF du NST est à l'origine d'effets complexes. Les corps cellulaires pourraient être inhibés alors que les fibres afférentes ou efférentes passant à proximité du NST seraient activées. Ces effets seraient alors à l'origine de modifications de la fréquence (augmentation et/ou inhibition) et du patron de décharge neuronale des noyaux des GB. Ces modifications permettraient de restaurer le patron de décharge neuronale, perturbé dans la maladie de Parkinson. Dès lors, l'effet thérapeutique bénéfique de la SHF du NST serait la résultante de plusieurs mécanismes convergents vers une restauration de l'activité neuronale des structures de sortie des GB [pour revue voir (Deniau et al., 2010)].

Les effets de la SHF dépendent donc de nombreux paramètres comme la nature des fibres ou l'organisation des connexions. Cependant, la plupart des études ne se sont intéressées qu'aux mécanismes neuronaux sous-tendant cette efficacité et l'implication des cellules gliales commence seulement à être investiguée. Comme nous allons le voir à présent, les cellules

gliales, et plus particulièrement les astrocytes, sont engagées dans pratiquement toutes les fonctions cérébrales. Nous verrons que les astrocytes interviennent de façon active dans la transmission synaptique, en conditions physiologique et pathologique, et qu'ils possèdent toutes les propriétés leur permettant d'être impliqués dans la SHF du NST.

IV Les astrocytes

IV.1. Les cellules gliales

IV.1.1. Présentation générale

Les cellules gliales représentent la majeure population cellulaire du névraxe (environ 90% des cellules sont des cellules gliales, contre seulement 10% de neurones chez l'homme). Le terme de « glie » a été introduit en 1858 par Rudolf Ludwig Karl Virchow, pour qui ces cellules étaient un tissu conjonctif dépourvu d'éléments cellulaires (Virchow, 1858). La diversité des cellules gliales a été ensuite mise en évidence par Camillo Golgi et Santiago Ramon y Cajal (Figure 20) (Kettenmann and Verkhratsky, 2008; Verkhratsky et al., 2011b). Les cellules gliales du système nerveux central (SNC) sont actuellement classées en différents types dont les principaux sont: les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules NG2 et les cellules microgliales. Les cellules épendymaires, présentes au niveau des ventricules et responsables de la production et de la circulation du liquide céphalo-rachidien, sont également considérées comme des cellules gliales. Au niveau du système nerveux périphérique, on trouve essentiellement les cellules de Schwann. Les astrocytes et les oligodendrocytes dérivent, tout comme les neurones, du neuroépithélium formant le tube neural. Leurs progéniteurs se différencieront en neuroblastes ou glioblastes. Les cellules microgliales, quant à elles, dérivent du mésoderme hemangioblastique et leurs progéniteurs sont des macrophages fœtaux (Verkhratsky and Butt, 2007).



Figure 20 : Les cellules gliales dessinées par Santiago Ramon y Cajal. Représentation des différents types de cellules gliales à partir d'une imprégnation de Golgi. Les cellules neurogliales de la couche corticale superficielle (A-D) et des couches profondes (E-R) sont représentées. D'après Verkhratsky et al., 2011.

En raison de leur incapacité à émettre des potentiels d'action, les cellules gliales ont longtemps été considérées comme de simples cellules de soutien ou cellules « nourricières » des neurones. Cette vision de cellules « passives » est aujourd'hui obsolète, puisqu'il est avéré que les cellules gliales et spécialement les astrocytes, utilisent une autre forme d'excitabilité que l'excitabilité électrique.

IV.1.2 Les différentes classes de cellules gliales

IV.1.2. a : Les oligodendrocytes.

Les oligodendrocytes, initialement décrits en 1928 par Del Rio Hortega, sont les cellules responsables de la synthèse de myéline au sein du SNC. La myéline est la couche lipidique permettant d'isoler électriquement les axones et de regrouper les canaux dépendant du voltage au niveau de sites particuliers, les nœuds de Ranvier (Hess and Young, 1949). L'ensemble de ces caractéristiques permet à la conduction nerveuse de s'effectuer de façon saltatoire, augmentant ainsi la vitesse de propagation de l'influx nerveux. La myélinisation axonale est un phénomène rapide et hautement régulé (Emery, 2010). Durant le développement, le premier signal impliqué dans la myélinisation est l'activité électrique neuronale. Dès lors, d'autres acteurs interviennent, comme certains ligands exprimés au niveau neuronal ou certaines molécules diffusibles (Bratl and Lassmann, 2009; Emery, 2010). Les oligodendrocytes possèdent de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs et répondent à l'activation de ces récepteurs par un signal calcique (Butt, 2006). Ces cellules peuvent avoir un rôle trophique, en sécrétant des facteurs neurotrophiques comme le BDNF, le GDNF (pour « Brain ou Glial Derived Neurotrophic Factor » respectivement) et l'IGF-1 (pour « Insulin Growth Factor 1 ») (Bratl and Lassmann, 2009).

IV.1.2. b : La microglie.

Les cellules microgliales sont les cellules immunocompétentes du système nerveux central. Elles se présentent sous trois états : quiescent, activé ou phagocytaire. Tout comme les oligodendrocytes, les cellules microgliales possèdent différents types de récepteurs aux neurotransmetteurs (Farber and Kettenmann, 2006). Cependant, elles expriment surtout des récepteurs pour différentes molécules du système immunitaire, leur permettant d'être activées en situations pathologiques (précisons que la microglie pourrait également avoir un rôle en condition physiologique, en contrôlant par exemple l'intégrité des synapses) (Graeber and Streit, 2009; Wake et al., 2009). Lors d'infection, de traumatisme, d'ischémie, de maladie neurodégénérative ou de toute modification homéostasique, les cellules microgliales sont activées et recrutées vers le site de la « lésion ». L'activation microgliale passe par différents stades, au cours desquels ces cellules sont sujettes à diverses modifications (modification de leur forme, de leur expression génique et membranaire ainsi que de leur fonctionnement)

(Verkhatsky and Butt, 2007; Graeber and Streit, 2009; Graeber, 2010; Kettenmann et al., 2011). Cette activation se traduirait également par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Cependant, ce phénomène n'a été décrit qu'*in vitro* (Farber and Kettenmann, 2006). Une fois activées, les cellules microgliales sont capables de libérer différents acteurs, impliqués dans la défense et la neuroprotection [comme des cytokines, du monoxyde d'azote, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des facteurs neurotrophiques, des facteurs de croissance ou des interleukines]. Elles peuvent également recruter d'autres cellules du système immunitaire, en libérant des molécules chimiotactiques. Enfin, elles permettent de diminuer l'excitotoxicité du glutamate, en surexprimant des transporteurs au glutamate. Hormis le stade dans lequel les cellules microgliales deviennent phagocytaires, l'activation microgliale est un phénomène réversible (Verkhatsky and Butt, 2007; Graeber and Streit, 2009; Graeber, 2010; Kettenmann et al., 2011).

IV.1.2. c : Les cellules NG2.

Les cellules NG2 ont longtemps été considérées comme étant des cellules précurseur des oligodendrocytes (OPC) en raison de l'expression de la molécule d'adhésion NG2, spécifique des OPCs. La molécule NG2 est un protéoglycane de 330 kDa résultant de l'association d'une protéine et d'un glycosaminoglycane: le chondroïtine sulfate. Durant le développement, tous les oligodendrocytes dérivent d'une cellule exprimant la molécule NG2. A l'inverse, toutes les cellules exprimant NG2 ne se différencieront pas en oligodendrocytes et certaines perdurent à l'âge adulte (figure 21) (Dawson et al., 2000; Nishiyama et al., 2005).

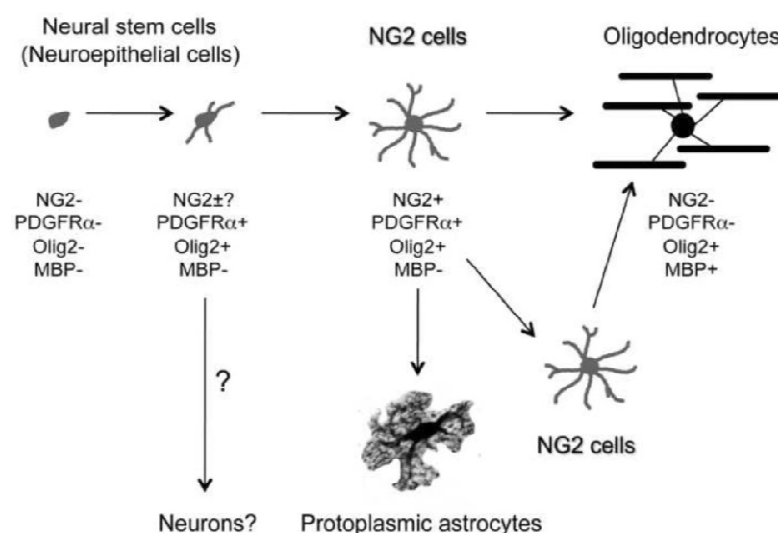


Figure 21 : Les cellules NG2 et les oligodendrocytes partagent les mêmes étapes de différenciation. Le précurseur des oligodendrocytes et des cellules NG2 exprime différentes molécules, dont la molécule NG2. Ce précurseur peut se différencier en oligodendrocyte mature (qui perd alors l'expression de la molécule NG2), en astrocyte ou en cellule NG2. Chez l'adulte, les cellules NG2 pourront donner de nouveaux oligodendrocytes, astrocytes ou neurones. D'après Trotter et al., 2010.

Chez l'adulte, ces cellules sont capables de se différencier en oligodendrocytes, neurones ou astrocytes (Dawson et al., 2000; Nishiyama et al., 2005; Wigley et al., 2007; Trotter et al., 2010). Malgré leurs caractéristiques antigéniques communes, les OPCs et les cellules NG2 peuvent présenter des caractéristiques différentes. Il a par exemple été montré que la survie des OPCs dépendait de l'intégrité des axones environnants, contrairement aux cellules NG2 qui persistent suite à la transection du nerf optique. Cela indique que les cellules NG2 possèdent certaines propriétés qui les différencient des OPCs (Greenwood and Butt, 2003). Les cellules NG2 sont souvent associées avec les neurones et peuvent recevoir des contacts glutamatergiques ou GABAergiques (Bergles et al., 2000; Lin and Bergles, 2004; Ziskin et al., 2007; Gallo et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré que les cellules NG2 peuvent être activées par des libérations de glutamate ou de GABA, qui induisent un signal calcique dans ces cellules (Lin et al., 2005; Paukert and Bergles, 2006; Hamilton et al., 2009). L'ensemble de ces caractéristiques laisse penser que les cellules NG2 pourraient avoir des rôles importants au niveau de la transmission synaptique et ne se limiteraient pas au rôle de progéniteur ou de cellule souche adulte.

IV.2. Physiologie et fonctions générales des astrocytes

Les astrocytes sont les cellules majoritaires du système nerveux central. Elles doivent leur nom à Michael Von Lenhossek, en raison de leur morphologie étoilée. Cette classe de cellules comprend différents types cellulaires, dont les principaux représentants sont les astrocytes protoplasmiques (retrouvés au niveau de la substance grise) et les astrocytes fibreux (retrouvés au niveau de la substance blanche). Les fonctions astrocytaires sont aussi diverses qu'essentiels. En effet, ces cellules sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie ionique et énergétique, mais interviennent également dans la synaptogenèse, la transmission neuronale ou la plasticité synaptique (Verkhratsky and Butt, 2007). Dans cette partie, nous présenterons les caractéristiques physiologiques des astrocytes ainsi que leurs principales fonctions. Par la suite, nous nous intéresserons plus particulièrement à la communication neurone-astrocyte et aux caractéristiques de la synapse tripartite.

IV.2.1. Caractéristiques membranaires et électrophysiologiques des astrocytes

Les astrocytes possèdent un corps cellulaire arrondi et de fines ramifications qui s'étendent sur 30 à 60 μm chez les rongeurs, et jusqu'à 200 μm chez l'homme (Oberheim et al., 2006). Les extensions membranaires sont en contact avec les vaisseaux sanguins et les synapses. Le prolongement d'un seul astrocyte est capable de contacter plusieurs synapses (au niveau de

l'hippocampe, il a par exemple été décrit qu'un même astrocyte pouvait contacter plus de 140 000 synapses) (Bushong et al., 2002).

Les astrocytes possèdent des caractéristiques électrophysiologiques qui leur sont propres. Ils présentent un potentiel de membrane très négatif (entre -80 et -90 mV), une résistance d'entrée faible (environ 50 MΩ) et une relation courant/potentiel linéaire (Barres, 1991; Bordey and Sontheimer, 2000; Oberheim et al., 2012). Enfin, les astrocytes sont incapables d'émettre des potentiels d'action (ce qui les a longtemps relégués au rang de cellules passives du SNC). Cependant, depuis les années 80, il est largement admis que, tout comme les neurones, les astrocytes expriment des canaux ioniques et des récepteurs aux neurotransmetteurs. Ils expriment des canaux calciques, sodiques et potassiques dépendants du voltage, des canaux potassiques activés par le calcium ou encore des canaux chlorures. La forte densité des canaux potassiques explique le potentiel de membrane négatif de ces cellules (Barres, 1991; Verkhratsky and Steinhauser, 2000; Kimelberg et al., 2006; Verkhratsky and Butt, 2007). La distribution des principaux ions de part et d'autre de la membrane plasmique astrocytaire est similaire à celle des neurones, hormis pour l'ion chlorure où le gradient est inversé (Kettenmann and Schachner, 1985). Outre l'expression de canaux ioniques, les astrocytes expriment également tous les récepteurs aux neurotransmetteurs et neuromodulateurs (Porter and McCarthy, 1997; Verkhratsky et al., 1998; Verkhratsky and Butt, 2007). Enfin, certaines molécules sont exprimées de manière spécifique par les astrocytes. C'est le cas de la protéine GFAP (pour « Glial Fibrillary Acidic Protein »). La GFAP est une protéine du cytosquelette couramment utilisée comme marqueur de la population astrocytaire. Précisons cependant que cette protéine n'est pas exprimée par tous les astrocytes et peut être retrouvée au niveau de certaines autres cellules, comme certaines cellules souches, des cellules épendymaires (chez l'homme) ou la glie radiaire (sauf chez les rongeurs) (Roessmann et al., 1980; Kimelberg, 2004). Parmi les autres marqueurs astrocytaires, on trouve la protéine de liaison au calcium S100B (Donato, 1999), l'enzyme glutamine synthase (Martinez-Hernandez et al., 1977) ou encore les transporteurs du glutamate GLT-1 (GLutamate Transporter-1) (Danbolt et al., 1992; Rothstein et al., 1994).

IV.2.2. Organisation spatiale

Au sein du système nerveux central, les astrocytes sont organisés de façon particulière, ce qui leur permet d'interagir entre eux ainsi qu'avec les neurones de manière spécifique. Comme nous allons le voir à présent, les astrocytes sont couplés entre eux et forment ainsi un syncytium astrocytaire. Cependant, cette organisation semble être plus complexe et différents niveaux d'agencement permettent aux astrocytes d'occuper des territoires exclusifs tout en étant regroupés en véritables réseaux fonctionnels.

IV.2.2. a : Organisation en syncytium.

Les astrocytes sont couplés entre eux et forment un syncytium astrocytaire. Plus précisément ce sont des jonctions communicantes de type gap qui sous-tendent ce couplage (Giaume et al., 2010). Les jonctions de type gap sont présentes dans différents types cellulaires où elles permettent des échanges métaboliques ou ioniques. D'un point de vue structurel, ces jonctions sont formées par l'apposition de structures particulières appelées connexons (ou hémicanaux). Un connexon est formé par l'assemblage de six sous-unités, appelées connexines, dont il existe 20 sous-types différents. Le pore du canal est formé par l'assemblage des deux connexons sur deux cellules voisines et permet la diffusion de petites molécules (inférieures à environ 1 kDa). Le couplage *via* ce type de jonctions permet donc la diffusion de certains ions ou petites molécules telles que certains transmetteurs. Ce mécanisme permet par exemple de redistribuer le potassium suite à sa recapture (Scemes and Spray, 2012) ou le passage interastrocytaire de molécules de signalisation comme l'ATP, l'IP₃ ou le glutamate (Harris, 2007).

Au niveau des astrocytes chez l'adulte, les connexines présentes sont majoritairement les connexines 43 (Cx 43) et 30 (Cx 30) [pour revue voir (Theis and Giaume, 2012)]. En fonction de la structure, le couplage inter-astrocytaire est un phénomène variable, pouvant présenter des différences au niveau du degré de couplage ou de l'organisation spatiale du réseau (Theis and Giaume, 2012). Par ailleurs, le couplage astrocytaire est un phénomène dynamique et les connexons s'assemblent et se désassemblent en permanence (Giaume and McCarthy, 1996). De plus, le degré de couplage ainsi que la perméabilité des jonctions gap peuvent être régulés de différentes manières, comme par exemple par l'activité neuronale (Marrero and Orkand, 1996), par des augmentations de la concentration de potassium extracellulaire (Enkvist and McCarthy, 1994) ou encore dans certaines conditions pathologiques (Koulakoff et al., 2008; Giaume et al., 2010; Theis and Giaume, 2012).

Comme nous le verrons par la suite, les astrocytes possèdent une forme d'excitabilité, basée sur les variations de concentrations intracellulaires de calcium. En culture cellulaire, il a été montré que ce signal calcique pouvait s'étendre à tout le réseau astrocytaire sous forme de vague calcique. Cette diffusion se ferait selon un mécanisme régénératif, par diffusion d'inositol triphosphate (IP₃) et de Ca²⁺ *via* les jonctions gap ou *via* la libération d'ATP (qui agirait de façon paracrine, en provoquant la libération d'IP₃ dans la cellule voisine) (Venance et al., 1995; Hassinger et al., 1996; Perea and Araque, 2005). Ainsi, les jonctions de type gap permettraient une communication inter-astrocytaire *via* la propagation de signaux calciques. Ces vagues calciques ont également été mises en évidence en tranches aigues de cerveau de rat (Haas et al., 2006; Schipke et al., 2008) mais elles sont plus locales et ne semblent pas s'étendre à tout le réseau astrocytaire. Ce phénomène reste peu documenté *in vivo* et serait plus restreint spatialement (Fiacco et al., 2009; Hoogland et al., 2009; Nimmerjahn et al., 2009). Une étude a cependant décrit un phénomène de propagation des signaux calciques au niveau de l'hippocampe *in vivo*, présentant certaines différences avec les vagues calciques couramment décrites. Ce

phénomène, qualifié de « glissando » par les auteurs, présente une vitesse de propagation plus rapide (environ 60 $\mu\text{m/s}$ contrairement à 10-20 $\mu\text{m/s}$ *in vitro*), une dépendance vis-à-vis de l'activité neuronale et une propagation sur de longues distances. Ce mode de propagation pourrait être un nouveau moyen de communication inter-astrocytaire, dépendant de l'activité neuronale environnante (Kuga et al., 2011).

IV.2.2. b : Organisation en « îlots synaptiques fonctionnels ».

Au-delà de leur organisation en syncytium, les astrocytes présentent un niveau d'organisation territorial particulier. De manière intéressante, il a été montré que les astrocytes occupent des territoires séparés ne se recouvrant que très peu, au niveau de leurs prolongements astrocytaires (Bushong et al., 2002) (figure 22A). Grâce à cette organisation, les astrocytes ne créent pas seulement un espace entre eux mais établissent des territoires qui sont exclusifs (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007b; Fellin, 2009). Cette organisation territoriale implique des conséquences fonctionnelles majeures. A ce stade, il faut préciser que des études de microscopie électronique ont montré que les prolongements astrocytaires sont capables de contacter les corps cellulaires, les dendrites, les épines dendritiques ou les terminaisons pré-synaptiques des cellules neuronales avoisinantes (Ventura and Harris, 1999). Cette organisation particulière des astrocytes au regard de la synapse a donné naissance au concept de synapse tripartite où l'élément neuronal pré-synaptique et post-synaptique sont enrobés par un prolongement astrocytaire (Araque et al., 1999). Nous reviendrons sur ce concept en détail par la suite. Mais si on superpose cette notion avec l'organisation territoriale que nous avons abordée ci-dessus, nous arrivons à la conclusion qu'un même neurone peut traverser plusieurs territoires astrocytaires et par conséquent, être contacté par plusieurs astrocytes, permettant une régulation différentielle de ses différents compartiments subcellulaires (figure 22B image de gauche). A l'inverse, un même astrocyte peut contacter et donc réguler l'activité de plusieurs neurones (quelques somas et des centaines de dendrites) (figure 22B image de droite). Cette organisation particulière définit des « îlots synaptiques fonctionnels » qui pourrait permettre de réguler plusieurs synapses de neurones différents, de manière coordonnée (Halassa et al., 2007b).

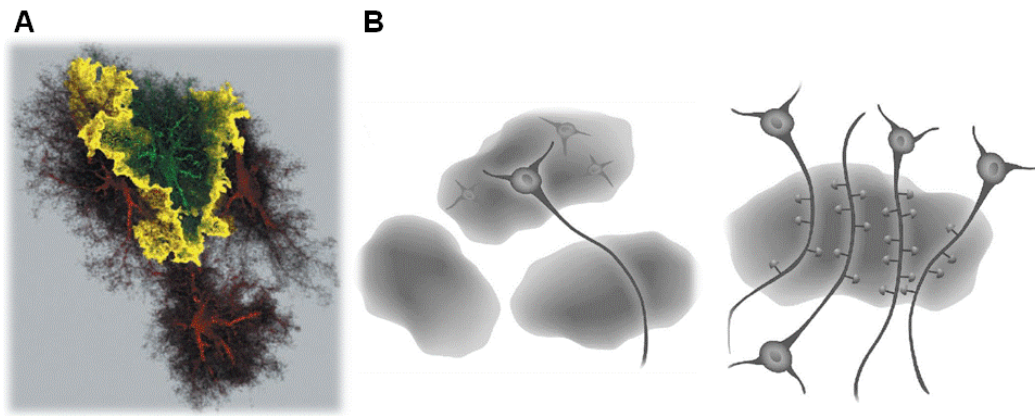


Figure 22 : Organisation spatiale des astrocytes. (A) Reconstruction en trois dimensions d'images confocales d'astrocytes adjacents marqués à l'Alexa 568 (en rouge) ou à l'Alexa 488 (en vert). Les territoires astrocytaires sont distincts avec moins de 5% de recouvrement entre 2 astrocytes voisins (zones en jaune). D'après Bushong et al., 2002. (B) Représentation schématique des îlots synaptiques. Un même neurone est contacté par plusieurs astrocytes (à gauche) et un même astrocyte contacte plusieurs dendrites de différents neurones (à droite). D'après Halassa et al., 2007

Malgré cette indépendance au niveau spatial, les astrocytes peuvent être regroupés en territoires fonctionnels, dont l'activation peut dépendre du type ou de la provenance du stimulus (Schipke et al., 2008; Perea et al., 2009). Au niveau du cortex visuel par exemple, il a été montré que les astrocytes sont regroupés en territoires (*i.e.* plusieurs astrocytes voisins) qui répondent de façon sélective par un signal calcique à des stimuli visuels d'orientations distinctes (figure 23) (Schummers et al., 2008; Fellin, 2009).

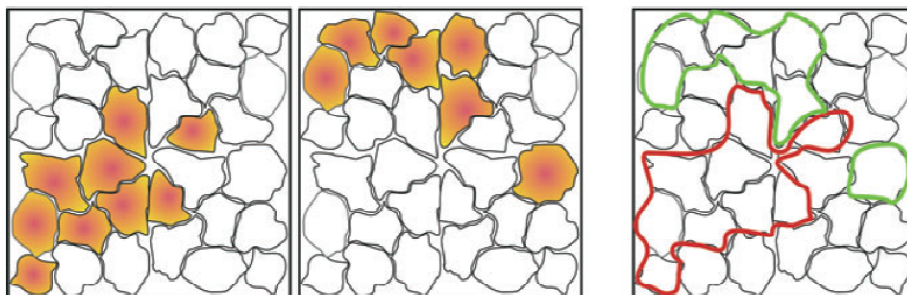


Figure 23 : Les astrocytes sont organisés en territoires fonctionnels in vivo. Représentation schématique de l'organisation des astrocytes en sous-groupes fonctionnels, en fonction de leur réponse calcique. Chaque forme délimitée par un trait noir représente un territoire astrocytaire individuel. Les astrocytes sont activés de manière spécifique lors de stimulations visuelles avec des orientations différentes. (panneau de gauche ou du milieu représentant les augmentations de calcium au sein des astrocytes). Le panneau de droite représente la superposition des deux territoires fonctionnels distincts. D'après Fellin, 2009.

Ainsi, les astrocytes présentent différents niveaux d'organisation qui leur permettent de réguler l'activité neuronale de manière sélective. L'organisation de plusieurs synapses en îlots fonctionnels confère un premier niveau de régulation, dont la spécificité est majorée par le faible degré de recouvrement entre les astrocytes. En parallèle, ces îlots synaptiques pourraient eux-mêmes être regroupés en territoires fonctionnels, différemment mis en œuvre en fonction du stimulus. Enfin, le syncytium astrocytaire représente un troisième niveau de régulation qui

permet, dans certaines conditions, d'accéder à une communication, et probablement à une régulation à distance.

IV.2.3 Le calcium : élément clé de l'excitabilité astrocytaire

La vision des astrocytes comme étant des cellules « passives » est aujourd'hui obsolète. En effet, grâce aux travaux d'Ann Cornell-Bell et Steve Finkbeiner en 1990, nous savons que les astrocytes sont dotés d'une excitabilité, reposant sur des variations intracellulaires de calcium (Cornell-Bell et al., 1990). La signalisation calcique astrocytaire est au centre de nombreuses fonctions que nous décrirons par la suite.

IV.2.2. a: Les acteurs de la signalisation calcique.

L'ion calcium (Ca^{2+}) intervient comme messager secondaire dans toute cellule eucaryote où il est impliqué dans un large panel de fonctions. Au niveau neuronal, le Ca^{2+} est impliqué dans l'émission et la régulation du potentiel d'action, dans la libération de neurotransmetteurs, dans les phénomènes de plasticité synaptique ou encore dans l'expression de certains gènes (Berridge, 1997). L'intervention du Ca^{2+} en tant que messager repose sur ses variations de concentrations intracellulaires, régulées grâce à de nombreux acteurs impliqués notamment dans sa libération ou son extrusion. La diversité de ces acteurs génère un codage spatio-temporel complexe et précis (Berridge et al., 2003). De manière générale, les cellules gliales comme les neurones, ont accès à deux sources de calcium. Une source extracellulaire, où l'entrée de Ca^{2+} est permise par des canaux calciques dépendant du voltage (Ca_v), des récepteurs ionotropiques couplés à une conductance calcique et des canaux activés par la déplétion des stocks internes (figure 24). Une seconde source se trouve au niveau intracellulaire, au sein du réticulum endoplasmique (RE). La libération de calcium résulte alors de l'activation de deux types de récepteurs : les récepteurs activés par l' IP_3 et les récepteurs de la ryanodine (RyR) (figure 24) (Verkhratsky and Kettenmann, 1996; Berridge, 1997; Berridge et al., 2003; Verkhratsky et al., 2011a). Ces deux familles de récepteurs sont sensibles au calcium et sont sujettes au phénomène de CICR (pour « Ca^{2+} Induced Ca^{2+} Release »). En effet, les récepteurs de l' IP_3 et de la ryanodine sont activés par le calcium qui exerce alors un rétrocontrôle positif sur leur activation. Cette activation se fait de manière biphasique : lorsque les stocks internes sont mobilisés, la libération de Ca^{2+} est majorée *via* le phénomène de CICR. Cependant, lorsque la concentration en calcium dépasse un certain seuil, l'effet du Ca^{2+} devient négatif et inhibe les récepteurs de l' IP_3 et/ou de la ryanodine. En parallèle, la sensibilité du calcium pour son récepteur peut être régulée (par l' IP_3 lui-même pour les récepteurs de l' IP_3 et par l'adénosine di-phosphate ribose cyclique (ADPRc) pour les RyR) (Berridge, 1997; Berridge et al., 2003). Lors du déclenchement de signaux Ca^{2+} , la concentration intracellulaire de Ca^{2+} peut passer de 30-40 nM à 200-800 nM. De trop grandes concentrations étant néfastes pour la cellule, il existe des systèmes tampons et différents moyens d'extrusion pour réguler les concentrations de cet ion. Ainsi, le Ca^{2+} est extrudé dans le

compartiment extracellulaire par l'action de pompes calciques ou par l'action d'échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Au niveau du RE, ce sont principalement des pompes de type SERCA (pour « Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPases ») qui permettent la recapture du Ca^{2+} (figure 24) (Verkhratsky and Kettenmann, 1996; Verkhratsky et al., 1998; Berridge et al., 2003).

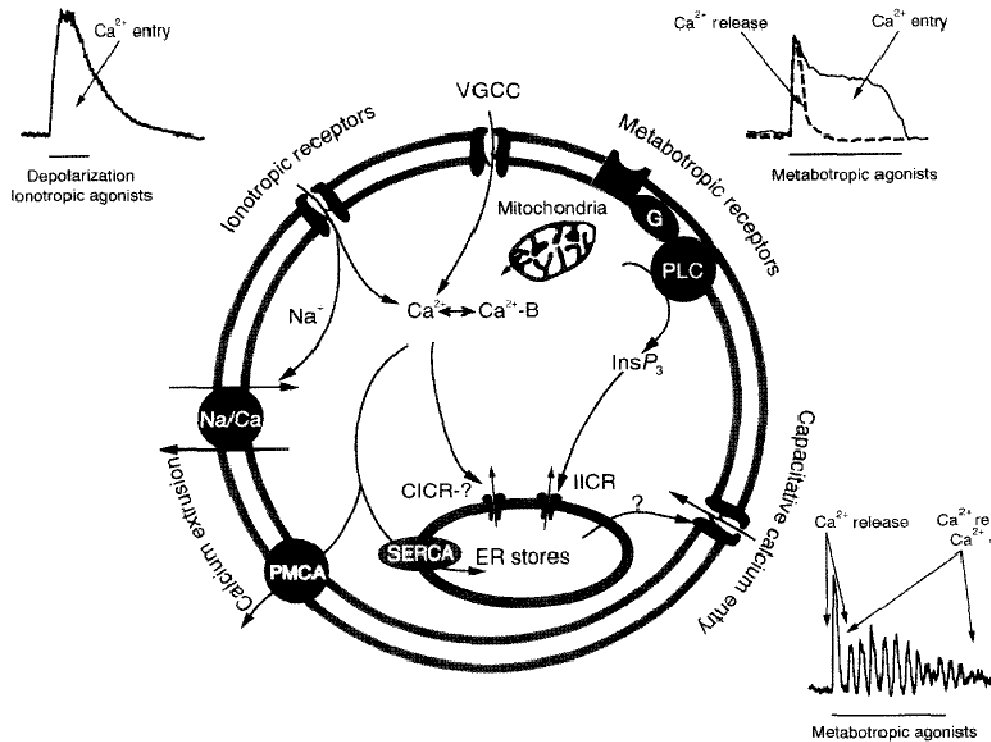


Figure 24 : Représentation schématique des principales voies de la signalisation calcique au niveau des astrocytes. Le schéma central représente les différentes sources de calcium (retrouvées au niveau extracellulaire ou intracellulaire, dans le reticulum endoplasmique). La mobilisation des contenus extracellulaires fait appel aux canaux calciques dépendants du voltage (VGCC) et aux récepteurs ionotropes. A l'inverse, le calcium intracytoplasmique est extrudé à l'extérieur de la cellule via des pompes ou des échangeurs. Concernant les stocks internes, la libération de calcium est sous-tendue par l'activation des récepteurs de la ryanodine ou de l' IP_3 . Le remplissage au niveau du reticulum se fait ensuite via la pompe SERCA. Les augmentations de calcium intracellulaires sont amplifiées par le phénomène de CICR. Les signaux calciques représentés sur les côtés montrent un exemple d'hétérogénéité de profil en fonction du type de voie activée. D'après Verkhratsky & Kettenmann, 1996.

IV.2.2. b: Codage spatio-temporel de la signalisation calcique astrocytaire.

Les astrocytes ont accès à toute la machinerie décrite ci-dessus pour déclencher et réguler des événements calciques et présentent une signalisation calcique variée en terme de codage spatial et temporel (Verkhratsky et al., 2011a). La première étude concernant l'excitabilité calcique des astrocytes a été menée en culture, et a montré que les astrocytes peuvent émettre un signal calcique suite à l'application de glutamate (Cornell-Bell et al., 1990). Depuis, cette particularité

est largement reconnue *in vivo* et on sait que le GABA, l'acétylcholine, l'histamine, l'adénosine, l'endothéline, les endocannabinoïdes ou encore l'ATP, sont également responsables de l'induction d'un signal calcique dans ces cellules (Verkhratsky and Kettenmann, 1996). D'autre part, les augmentations de calcium intracellulaires peuvent également avoir lieu de façon spontanée (nous reviendrons sur ce type d'activité par la suite).

La diversité des fonctions dépendantes du calcium est codée par différentes typologies de signaux calciques, qui peuvent être régionalisées au sein de la cellule. En effet, le profil du signal calcique varie en fonction du type de stimulus. Les signaux peuvent se présenter sous forme de pics, de plateaux ou d'oscillations, codés en amplitude et en fréquence (figure 24) (Verkhratsky et al., 1998; Perea and Araque, 2005). De plus, lors d'activités spontanées ou évoquées, les augmentations de calcium peuvent être restreintes au niveau de certains domaines sub-cellulaires (Araque et al., 2002; Panatier et al., 2011). Cela suggère l'existence de sous-domaines cellulaires fonctionnels. Cette caractéristique confère aux astrocytes, la capacité d'être activés de façon spécifique et régionalisée. Au niveau de l'hippocampe par exemple, un même astrocyte peut être activé par l'acétylcholine provenant des fibres de l'alveus ou par le glutamate provenant des collatérales de Schaeffer. Cependant, le glutamate, également libéré par les fibres de l'alveus, n'induit pas de signal calcique et est directement recapté par l'astrocyte. Ainsi, les astrocytes sont capables de répondre de manière sélective à différents types de neurotransmetteurs et de discriminer deux afférences utilisant le même neurotransmetteur (Perea and Araque, 2005; Perea et al., 2009).

Les signalisations calciques astrocytaire et neuronale présentent des caractéristiques différentes. Tout d'abord, les augmentations intracellulaires de calcium dans les astrocytes résultent principalement de l'activation des récepteurs de l'IP₃, menant à une mobilisation des stocks internes. Concernant les neurones, les sources extracellulaires et intracellulaires sont impliquées de manière équivalente (Carmignoto, 2000; Agulhon et al., 2008). Les signaux calciques astrocytaires présentent une plus grande amplitude et une durée plus longue par rapport aux signaux neuronaux (Volterra and Meldolesi, 2005). Enfin, les informations calciques sont codées différemment dans les deux types cellulaires. L'activité neuronale serait préférentiellement régulée par la fréquence et non par l'amplitude des oscillations calciques astrocytaires. En effet, une augmentation de l'activité neuronale s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des oscillations calciques au sein de l'astrocyte (Pasti et al., 1997; Carmignoto, 2000). A l'inverse, lorsqu'un astrocyte est activé par différents neurotransmetteurs, l'amplitude globale du signal ne correspond pas à la somme des amplitudes des différents signaux, ce qui sous-entend que l'activité calcique astrocytaire n'est pas modulée de manière linéaire par l'activité neuronale (Perea et al., 2009).

IV.2.2. c: Activités calciques spontanées.

L'une des particularités de la signalisation calcique astrocytaire est liée au fait que ces augmentations de calcium intracellulaires peuvent avoir lieu de façon spontanée (*i.e.* indépendamment de toute activité neuronale). La première étude concernant les activités calciques spontanées a été réalisée en tranches, dans le thalamus où il a été montré que ces activités étaient dépendantes d'une libération des stocks internes et responsables d'une activation neuronale *via* l'activation des récepteurs NMDA (Parri et al., 2001). Depuis, ces activités calciques ont été décrites dans de nombreuses structures comme le cortex, l'hippocampe, le striatum, l'hypothalamus ou encore la moelle épinière (Aguado et al., 2002). Elles sont également retrouvées *in vivo*, où elles présentent des propriétés similaires en termes d'amplitude, de fréquence et de profils (oscillations, pics ou plateaux) (Hirase et al., 2004). Ces activités calciques spontanées résultent principalement de la libération de calcium du RE, suite à l'activation des récepteurs de l'IP₃ (Parri and Crunelli, 2003; Wang et al., 2006; Kawamura and Kawamura, 2011). Au sein des astrocytes, les augmentations spontanées de calcium peuvent avoir différentes conséquences. Elles peuvent par exemple induire des libérations de glutamate comme cela a été montré au niveau de l'hippocampe. Cette libération « spontanée » de glutamate augmenterait la probabilité de libération des neurotransmetteurs (en activant les récepteurs mGluR1 situés au niveau pré-synaptique) (Bonansco et al., 2011). Les activités calciques spontanées peuvent également être impliquées dans la synchronisation de l'activité neuronale. Au niveau du néocortex, le potentiel des neurones peut être dans un état dépolarisé (état « up ») ou plus polarisé (« down »). Les états « up » seraient impliqués dans divers phénomènes comme le sommeil, l'attention ou la mémoire. Grâce à leurs activités spontanées, les astrocytes seraient impliqués, au niveau du cortex somatosensoriel, dans la synchronisation des neurones dans cet état « up », participant ainsi aux fonctions décrites ci-dessus (Poskanzer and Yuste, 2011).

L'une des caractéristiques importantes de ces oscillations spontanées, est qu'elles peuvent survenir de manière synchrone entre les astrocytes (Aguado et al., 2002; Hirase et al., 2004). Plus précisément, une étude réalisée sur une large population d'astrocytes et durant une longue période (156 ± 69 cellules durant 60 minutes), a montré que les astrocytes sont regroupés en « clusters » au sein desquels les activités calciques sont synchrones. La régulation de cette synchronie pourrait être dépendante de l'activité neuronale (Aguado et al., 2002) ou d'interactions inter-astrocytaires (Sasaki et al., 2011). Ces phénomènes de synchronisation en réseaux permettraient de moduler l'excitabilité neuronale de façon régionalisée et constitue un mode de communication inter-astrocytaire plus probable que la propagation de vagues calciques exhaustives (Sasaki et al., 2011).

En conclusion, l'excitabilité calcique des astrocytes leur permet d'être « à l'écoute » de l'activité neuronale environnante. D'autre part, de par leur organisation spatiale particulière et grâce à la

régionalisation de leur signalisation calcique, les astrocytes peuvent être activés de façon spécifique.

IV.2.4. Diversité des fonctions astrocytaires chez l'adulte

A l'heure actuelle, l'importance et la diversité des fonctions astrocytaires sont largement reconnues. Globalement, ces cellules interviennent à trois niveaux : **1)** au niveau du maintien de l'équilibre énergétique, ionique et hydrique, **2)** dans la régulation de la concentration en neurotransmetteurs dans l'espace synaptique et extrasynaptique et **3)** dans la libération de gliotransmetteurs. Nous allons à présent décrire certaines de ces fonctions astrocytaires. Le rôle des astrocytes dans la transmission synaptique sera détaillé de manière plus précise dans le chapitre concernant la synapse tripartite (§ IV.3).

IV.2.4. a: Maintien du métabolisme énergétique et de l'homéostasie ionique.

Bien que représentant seulement 2% du poids du corps humain, le cerveau consomme environ 20% du glucose et de l'oxygène, qu'il puise dans la circulation sanguine. Le glucose traverse la barrière hémato-encéphalique par le biais de transporteurs du glucose (GLUT) exprimés par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Une fois dans l'espace extra-cellulaire, il est recapté par les neurones et les astrocytes, exprimant tous deux des transporteurs GLUT. Les neurones consomment 90% de l'énergie mais la recapture du glucose est équivalente dans les deux types cellulaires. Les astrocytes servent ensuite de « support métabolique » aux neurones *via* le cycle du lactate. Après recapture du glucose, celui-ci est transformé en pyruvate puis en lactate, grâce à la glycolyse. Le lactate est alors transféré dans l'élément neuronal, où il entrera dans le cycle tricarboxylique afin de fournir de l'ATP, principal substrat énergétique impliqué dans les fonctions neuronales (figure 25) (Tsacopoulos and Magistretti, 1996; Pellerin, 2010).

Lors d'une activité neuronale, les besoins énergétiques sont augmentés, résultant en une augmentation du débit sanguin cérébral. Ce phénomène de couplage entre l'activité neuronale et le flux sanguin est qualifié d'hyperhémie fonctionnelle et est contrôlé par les astrocytes. Les astrocytes sont en effet en contact avec les vaisseaux sanguins, au niveau de structures particulières : les pieds astrocytaires (ou périvasculaires). Au niveau de leurs pieds astrocytaires, ces cellules sont capables de libérer des substances vasoactives, contrôlant ainsi le débit sanguin cérébral de manière locale (Zonta et al., 2003; Magistretti, 2006; Petzold and Murthy, 2011).

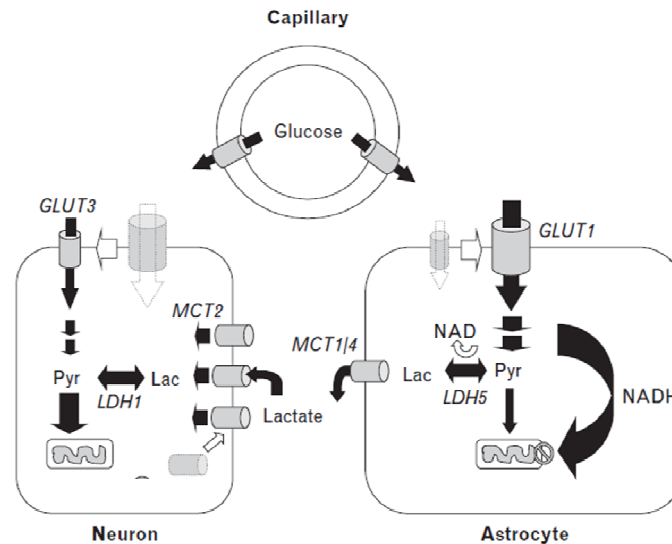


Figure 25: Les astrocytes sont un soutien énergétique pour les neurones. Représentation schématique de la recapture du glucose et de la glycolyse dans les astrocytes et les neurones. Le glucose est transporté dans le milieu intracellulaire grâce aux transporteurs GLUT3 dans les neurones et GLUT1 dans les astrocytes. Le glucose entre alors dans le cycle de la glycolyse. Au niveau de l'astrocyte la glycolyse permet de libérer du lactate dans le milieu extracellulaire (via l'action des transporteurs MCT1 et 4). Le lactate est recapté par le neurone via l'action des transporteurs MCT2. Celui-ci est transformé en pyruvate via l'action de la LDH1 et sert alors de substrat énergétique au neurone. MCT : monocarboxylate transporter, LDH : lactate dehydrogenase. D'après Pellerin 2010.

Outre la régulation du métabolisme énergétique, les astrocytes sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie ionique, grâce à l'expression de différents transporteurs et canaux ioniques [pour revue voir (Simard and Nedergaard, 2004)]. Le contrôle de la concentration ionique extracellulaire est primordial car toute modification affecte les propriétés membranaires et donc l'excitabilité des cellules. Le potassium est particulièrement concerné car sa concentration extracellulaire peut doubler localement lors d'une transmission synaptique. Les astrocytes sont capables de réguler cette concentration selon deux mécanismes. Le premier est qualifié de « transient storage » et consiste en un stockage transitoire en attendant la diminution de la concentration potassique extracellulaire. Lorsque ce mécanisme est saturé, le « spatial buffering » intervient à son tour. Il consiste en la recapture du potassium puis en sa diffusion dans tout le réseau astrocytaire, *via* les jonctions de type gap décrites précédemment. La recapture du potassium à proprement parler, peut se faire *via* une pompe Na^+/K^+ ou *via* une diffusion passive par des canaux ioniques (Walz, 2000).

Lors d'une transmission de potentiel d'action, la recapture du potassium extracellulaire s'accompagne d'une augmentation du volume d'eau dans les astrocytes. Par ailleurs, la recapture de l'eau au niveau de la synapse permettrait de diminuer le volume de la fente synaptique, concentrant ainsi les neurotransmetteurs libérés [pour revue voir (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003; Simard and Nedergaard, 2004)]. Pour cela, les astrocytes expriment, au niveau de leurs prolongements, des canaux perméables à l'eau : les aquaporines 4. Une fois recaptée,

l'eau est redistribuée dans tout le réseau astrocytaire. D'autre part, la régulation de l'homéostasie de l'eau est un paramètre important dans la régulation de l'osmolarité. Les astrocytes régulent alors les échanges d'eau entre le sang et le parenchyme cérébral. Pour cela, les pieds astrocytaires expriment également les aquaporines 4. Enfin, les astrocytes libèrent et expriment des récepteurs aux neuropeptides (comme l'atriopeptine, l'angiotensinogène ou la vasopressine), impliqués le contrôle de l'homéostasie de l'eau [pour revue voir (Simard and Nedergaard, 2004; Benfenati and Ferroni, 2009)].

IV.2.4. b: Recapture des neurotransmetteurs.

L'expression de transporteurs de différents neurotransmetteurs permet aux astrocytes de réguler la concentration en neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ce phénomène permet, non seulement, de maintenir l'homéostasie des neurotransmetteurs, mais également de réguler leur action dans la fente synaptique.

Les transporteurs du glutamate existent sous cinq formes différentes, dont la nomenclature diffère selon les espèces. Chez l'homme, on distingue les EAAT 1 à 5 (pour « Excitatory Amino Acid Transporter » 1 à 5). Chez le rat, EAAT 1, 2 et 3 sont équivalents à GLAST, GLT-1 et EAAC1 respectivement (Verkhratsky and Butt, 2007). Les transporteurs EAAT 1 et 2 (GLAST et GLT-1) sont exprimés par les astrocytes (GLAST étant retrouvé au niveau neuronal et astrocytaire contrairement à GLT-1, spécifique de astrocytes). La recapture du glutamate utilise la force motrice des gradients électrochimiques du sodium et du potassium. En effet, l'entrée d'une molécule de glutamate est couplée à celle de trois ions Na^+ et un H^+ , et à la sortie d'un ion K^+ (Huang and Bergles, 2004; Eulenburg and Gomeza, 2010). Cette recapture permet de lutter contre les phénomènes d'excitotoxicité liés à ce neurotransmetteur. Une fois recapté, le glutamate est transformé en glutamine dans l'espace cytoplasmique de l'astrocyte. La glutamine est alors libérée dans l'espace extracellulaire, avant d'être transportée dans l'élément pré-synaptique neuronal, où elle sera à nouveau convertie en glutamate (figure 26) (Tsacopoulos and Magistretti, 1996).

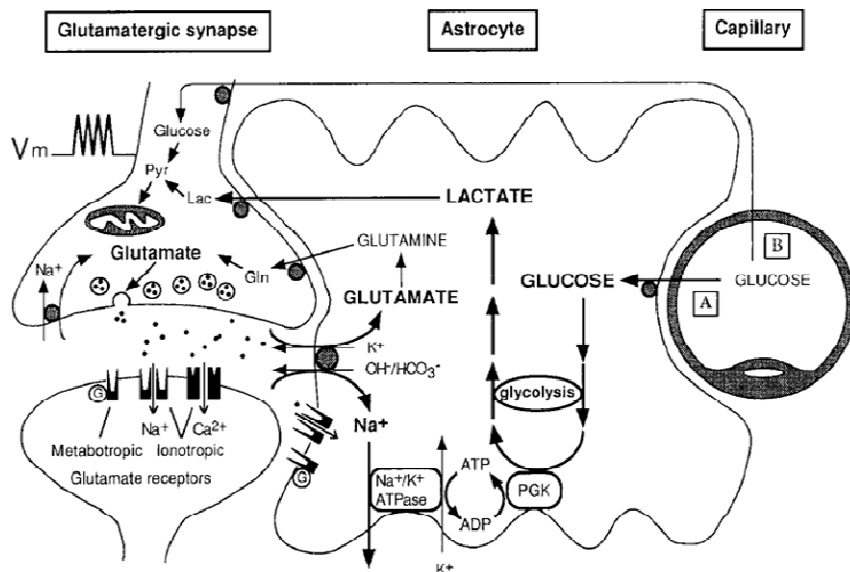


Figure 26 : Les astrocytes sont impliqués dans le couplage métabolique et participent à l'extrusion du glutamate de la fente synaptique. Représentation schématique de la glycolyse et du cycle glutamate/glutamine dans les astrocytes. La recapture du glutamate permet d'en diminuer la concentration dans la fente synaptique. Le glutamate entre dans le cycle glutamate/glutamine, puis la glutamine est recaptée dans l'élément neuronal afin de renouveler le stock de glutamate. D'après Tsacopoulos and Magistretti, 1996.

Les transporteurs du GABA sont également exprimés par les astrocytes, mais il ne semble pas exister de spécificité neuronale ou astrocytaire. Il existe quatre types de transporteurs du GABA, connus chez le rat sous le nom de GAT-1 (pour « GABA transporter 1 »), GAT-2 et 3 et BGT-1 (pour « Bétaine/GABA transporter ») (Schousboe, 2003; Eulenburg and Gomeza, 2010). Le transport du GABA est couplé à celui des ions Na^+ et Cl^- , avec une stœchiométrie de deux ions Na^+ et un ion Cl^- entrant, par molécule de GABA. Cependant, l'ion Cl^- permettrait seulement d'augmenter le transport, sans être pour autant indispensable (Eulenburg and Gomeza, 2010).

Enfin, les astrocytes exprimeraient également d'autres transporteurs des neurotransmetteurs, comme les transporteurs de la glycine, ou encore des monoamines (dopamine, norépinephrine et sérotonine) (Eulenburg and Gomeza). Mais peu de données existent à ce sujet.

IV.2.4.c : Libération de gliotransmetteurs.

L'une des découvertes les plus récentes concernant les astrocytes est leur aptitude à libérer des gliotransmetteurs, capables de moduler l'excitabilité neuronale ou la transmission synaptique. Le premier gliotransmetteur mis en évidence a été le glutamate (Parpura et al., 1994), puis d'autres comme l'ATP (Wang et al., 2000) et la D-sérine (Mothet et al., 2000) ont suivi. Il a été plus récemment montré que les astrocytes sont également capables de libérer du GABA (Angulo et al., 2008; Heja et al., 2009; Lee et al., 2010) ou des neuropeptides.

Dans le domaine de la gliotransmission, le mécanisme de libération reste encore soumis à polémique. En effet, certaines études font état d'une exocytose, alors que d'autres mettent en

avant des mécanismes non vésiculaires. La libération vésiculaire (ou exocytose) est la principale voie de libération des neurotransmetteurs par les neurones. Cette voie est dépendante du calcium et fait intervenir toute une machinerie protéique particulière. En effet, elle requiert l'intervention de molécules responsables du remplissage des vésicules, de son arrimage avec la membrane plasmique puis de la fusion des deux membranes. Au niveau de la membrane vésiculaire, ce sont les protéines synaptotagmine I et synaptobrevine (ou VAMP2 pour « vesicle-associated protein 2 »). Sur la membrane plasmique, on trouve la syntaxine et SNAP 25 (synaptosome-associated protéine). Ces protéines interagissent pour former le complexe SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor associated protein receptor) qui permettrait d'ancrer les vésicules synaptiques à la membrane pour les mener à la fusion (figure 27A) (Sutton et al., 1998). Il est aujourd'hui admis que les astrocytes expriment certaines protéines impliquées dans l'exocytose, comme les protéines du complexe SNARE ou encore la synaptotagmine I (figure 27A) (Bezzi et al., 2004; Volterra and Meldolesi, 2005; Halassa et al., 2009; Hamilton and Attwell, 2010).

Pour conforter l'hypothèse de l'exocytose, il a été montré que les astrocytes expriment la protéine VGLUT (vesicular glutamate transporter) ou VNUT (vesicular nucleotide transporter), permettant de remplir les vésicules en glutamate et en ATP (Bezzi et al., 2004; Volterra and Meldolesi, 2005; Halassa et al., 2009; Hamilton and Attwell, 2010; Verkhratsky et al., 2011b) respectivement. Les études confirmant l'hypothèse d'une libération vésiculaire sont diverses et ont montré l'implication du complexe SNARE ou du calcium dans la libération de gliotransmetteurs. Cependant ces études concernent essentiellement le glutamate, l'ATP et la D-Sérine (Araque et al., 2000; Pascual et al., 2005; Panatier et al.; Verkhratsky et al., 2011a).

A l'inverse, certaines études ont montré que le calcium n'était pas impliqué dans la gliotransmission (Fiacco et al., 2007; Agulhon et al., 2010). Todd A. Fiacco et collaborateurs en 2007, ont en effet montré que l'induction d'un signal calcique dans un astrocyte ne provoquait pas de gliotransmission. L'induction d'un signal calcique de manière spécifique dans ces cellules a été réalisée grâce à l'utilisation de souris transgéniques, exprimant un récepteur métabotrope (MrgA1), sous le promoteur de la GFAP. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'induction d'un signal calcique (*via* la stimulation des récepteurs MrgA1) ne modifie pas l'activité synaptique, ce qui sous-entend qu'aucune gliotransmission n'a été induite. La libération de gliotransmetteurs pourrait alors résulter de mécanismes non vésiculaires (Fiacco et al., 2007). Les mécanismes de libération non vésiculaires pourraient être de différents types (figure 27B) et faire appel à : **1**) l'implication des transporteurs qui fonctionneraient de façon inversée (Anderson and Swanson, 2000; Hamilton and Attwell, 2010), **2**) la libération *via* les hémicanaux (Ye et al., 2003; Hamilton and Attwell, 2010), **3**) la diffusion *via* les récepteurs ionotropiques de l'ATP (de type P2X₇) (Fellin et al., 2006; Hamilton and Attwell, 2010), **4**) la libération d'acides aminés comme le glutamate ou la taurine *via* les canaux anioniques activés par des modification du volume (Kimelberg et al., 2006; Hamilton and Attwell, 2010).

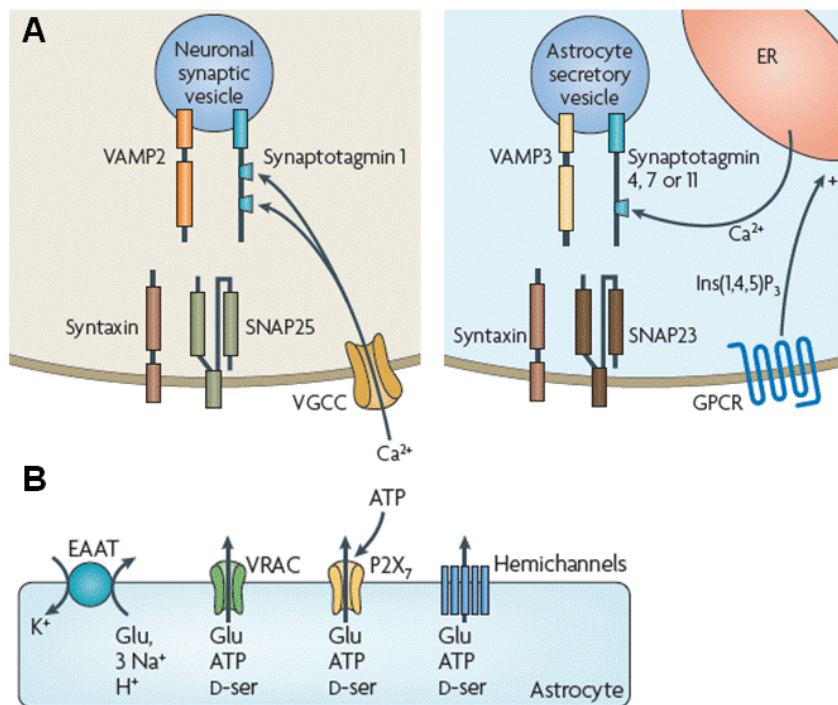


Figure 27 : Les astrocytes peuvent libérer des gliotransmetteurs par des mécanismes vésiculaires ou non vésiculaires. A. Représentation schématique de l'exocytose neuronale (à gauche) et astrocytaire (à droite). Les astrocytes possèdent les protéines impliquées dans l'exocytose, capables de former le complexe SNARE. B. Représentation schématique des mécanismes non vésiculaires de gliotransmission. La libération de gliotransmetteur peut faire intervenir les transporteurs au glutamate (EAAT), les canaux activés par des modifications de volume (VRAC), les récepteurs ionotropiques de l'ATP (P2X₇), ou les hémicanaux. D'après Hamilton and Attwell, 2010.

En conclusion, grâce à leur organisation spatiale particulière et leurs différentes fonctions, les astrocytes interviennent à différents niveaux dans le soutien et la régulation de l'activité neuronale. Comme nous allons le voir à présent, cette régulation a pris tout son sens lorsqu'on a mis en évidence une proximité physique entre les prolongements astrocytaires et les éléments pré-et post-synaptiques neuronaux.

IV.3. La synapse tripartite

Le terme de synapse tripartite a été introduit dans les années 1990 et représente un concept nouveau de la physiologie de la synapse (figure 28) (Araque et al., 1999). Comme nous l'avons décrit précédemment, ce terme reflète l'étroite interaction entre un prolongement astrocytaire et les éléments pré- et post-synaptiques. Grâce à cette organisation, les astrocytes sont au premier rang lors d'une transmission synaptique et ils établissent une communication bidirectionnelle

avec les neurones. Les rôles des astrocytes au sein de la synapse tripartite sont divers : **1)** ils régulent les homéostasies ionique, métabolique, hydrique et en neurotransmetteur, nécessaires au bon fonctionnement neuronal, **2)** ils régulent la fonction des neurotransmetteurs en contrôlant leur concentration dans la fente synaptique et **3)** ils libèrent des gliotransmetteurs capables de moduler la transmission synaptique.

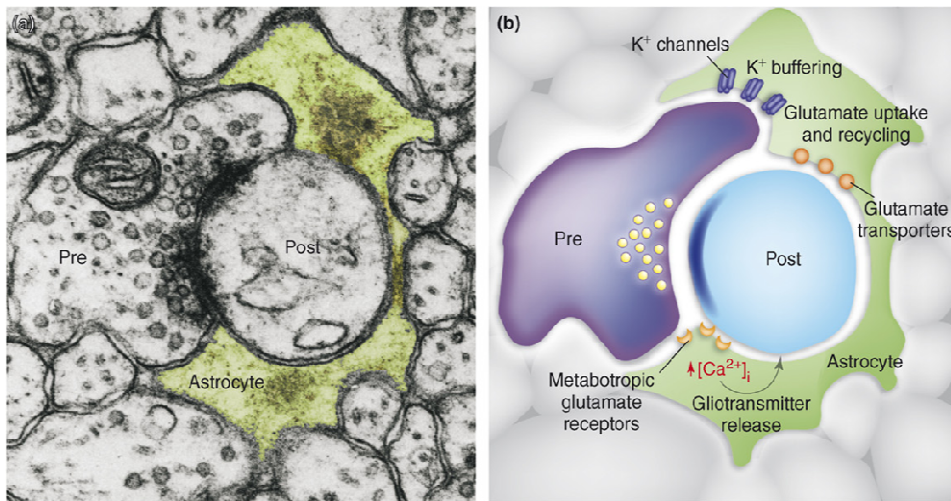


Figure 28: Les prolongements astrocytaires sont le troisième constituant de la synapse tripartite. Représentations d'une synapse tripartite obtenue en microscopie électronique (a) et schématisée (b). Le prolongement astrocytaire (en vert) enrobe la synapse. Du point de vue fonctionnel, l'astrocyte régule les homéostasies ionique et du glutamate via la recapture du potassium et du glutamate respectivement. La libération de neurotransmetteurs active les récepteurs de l'astrocyte et induit un signal calcique. Le signal calcique peut alors conduire à une libération de gliotransmetteurs. D'après halassa et al., 2007a.

IV.3.1. Recouvrement astrocytaire : un phénomène dynamique

Dans le système nerveux central, toutes les synapses ne sont pas tripartites [au niveau de l'hippocampe par exemple, 57% des synapses sont en contact avec un astrocyte (Ventura and Harris, 1999)]. De manière intéressante il a été montré que les astrocytes enrobent préférentiellement les synapses actives (Hirrlinger et al., 2004). Cependant, l'enrobage astrocytaire étant un phénomène dynamique, cela permet d'adapter le recouvrement en fonction de l'activité synaptique. Ainsi, les astrocytes peuvent envelopper des synapses qui n'étaient pas tripartites lorsque les conditions le requièrent, comme par exemple au niveau de l'hippocampe, où l'induction d'une potentialisation à long terme (LTP) s'accompagne d'une augmentation de la couverture synaptique (Wenzel et al., 1991). Le remaniement du recouvrement astrocytaire peut-être un phénomène rapide comme cela a été montré au niveau de l'hippocampe où des expériences de microscopie confocale en temps réel ont révélé un rapide remodelage des synapses tripartites, avec des extensions ou des rétractions de prolongements astrocytaires qui se

produisaient dans des temps de l'ordre de la minute (Haber et al., 2006a). Par ailleurs, le recouvrement astrocytaire peut-être un phénomène transitoire, comme au niveau du noyau supraoptique de l'hypothalamus, où la couverture astrocytaire est modifiée durant la lactation, permettant d'optimiser la transmission glutamatergique durant cette période (Oliet et al., 2006). La dynamique du recouvrement a également été décrite *in vivo* : au niveau du cortex somatosensoriel, la stimulation des vibrisses du rat entraîne une augmentation de la couverture astrocytaire au niveau du « tonneau » correspondant (Genoud et al., 2006). De même, une stimulation visuelle est à l'origine d'une augmentation de la surface de contact entre neurones et astrocytes au niveau du cortex visuel (Jones et al., 1996).

Enfin, le recouvrement astrocytaire peut-être augmenté lors de certaines pathologies, afin de compenser certaines perturbations de la transmission ou de limiter l'excitotoxicité (Villalba and Smith, 2011). Ce phénomène a notamment été décrit dans la maladie de Parkinson et nous y reviendrons par la suite.

IV.3.2. Gliotransmission et régulation de l'activité neuronale

La libération de gliotransmetteurs peut moduler l'excitabilité neuronale ou réguler la libération de neurotransmetteurs, en agissant au niveau pré- ou post-synaptique. Ainsi, les astrocytes interviennent de façon active dans divers aspects de l'activité neuronale et peuvent être impliqués dans des phénomènes de plasticités synaptiques.

La libération de glutamate peut, par exemple, moduler l'excitabilité neuronale en dépolarisant la membrane post-synaptique (figure 29A). En effet, plusieurs études ont montré que la libération de ce gliotransmetteur induisait un courant entrant dans l'élément post-synaptique, *via* l'activation des récepteurs NMDA (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Perea et al., 2009). Par ailleurs, ce courant entrant peut être retrouvé au niveau de plusieurs neurones de façon simultanée, ce qui sous-entend que les astrocytes sont capables de synchroniser l'activité de plusieurs neurones (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004). La libération du glutamate peut également moduler la libération de neurotransmetteurs, en agissant au niveau pré-synaptique (figure 29B). Au niveau des synapses glutamatergiques de l'hippocampe par exemple, la libération de glutamate par les astrocytes active les récepteurs métabotropiques mGluR1 pré-synaptiques. Cette activation augmente la libération de glutamate neuronale et se traduit par une augmentation de la fréquence des courants excitateurs post-synaptiques spontanés (sEPSC) et évoqués (eEPSC) (Fiacco and McCarthy, 2004; Perea and Araque, 2007). De la même façon, la libération de glutamate par les astrocytes peut augmenter la libération de GABA *via* l'activation des récepteurs AMPA et NMDA situés au niveau pré-synaptique des synapses GABAergiques de l'hippocampe (Kang et al., 1998). La libération du glutamate peut avoir l'effet inverse et diminuer la probabilité de libération de neurotransmetteurs, en activant les récepteurs

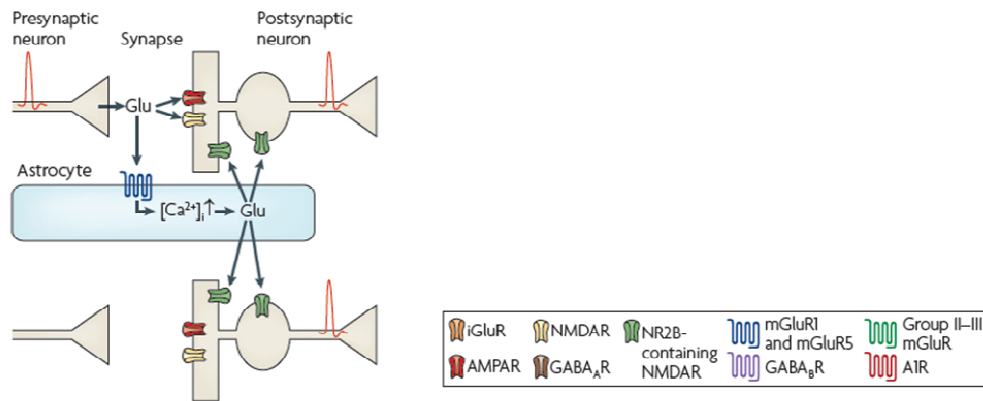
métabotropiques pré-synaptiques du groupe II et III (Liu et al., 2004). Enfin, la libération de glutamate peut être impliquée dans des phénomènes de plasticité synaptique. Au niveau de l'hippocampe, la libération de glutamate par les astrocytes peut, en effet, induire une potentialisation à long terme (LTP), lorsque celle-ci se fait en même temps qu'une dépolarisation post-synaptique. La coïncidence de l'activation des astrocytes et de la dépolarisation post-synaptique est alors permise par l'acétylcholine provenant des collatérales de Schaeffer (Navarrete et al., 2012).

En ce qui concerne l'ATP, les effets de ce gliotransmetteur sont complexes. Lorsqu'il est libéré par les astrocytes, l'ATP peut activer les récepteurs purinergiques métabotropiques (P_2Y) ou ionotropiques (P_2X) (Fields and Burnstock, 2006). Cette activation peut moduler la transmission synaptique, comme au niveau de l'hypothalamus où l'activation des récepteurs $P2X_7$, situés au niveau post-synaptique des synapses glutamatergiques, augmente la libération de glutamate (Gordon et al., 2005). Cependant, comme nous l'avons décrit dans le § I.3.4, l'ATP extracellulaire est très rapidement dégradé en adénosine et active alors les récepteurs de type A_1 ou A_{2A} (Halassa et al., 2009; Boison et al., 2010). L'adénosine est notamment impliquée dans les phénomènes de dépression hétéro-synaptique. Prenons l'exemple de l'hippocampe : lors d'une activation des collatérales de Schaeffer, le glutamate libéré active les neurones GABAergiques de l'hippocampe. La libération de GABA qui en résulte permet d'activer les astrocytes, qui répondent par une libération d'ATP. Celui-ci est dégradé en adénosine, qui, *via* l'activation des récepteurs de type A_1 sur les collatérales de Schaeffer, pourra inhiber la libération de glutamate (figure 29C) (Pascual et al., 2005; Serrano et al., 2006).

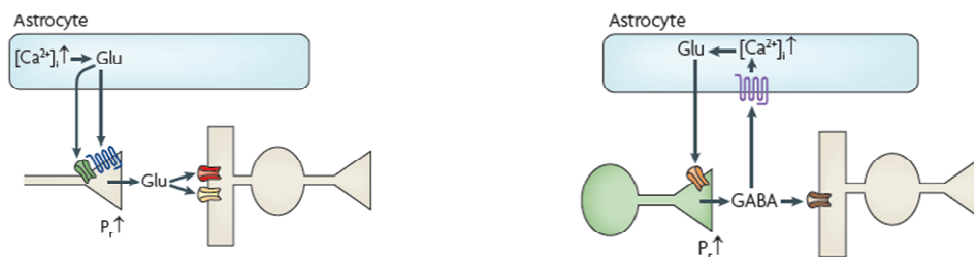
La libération de D-sérine (synthétisée par la sérine racémase au niveau des astrocytes) occupe une place importante dans les phénomènes de gliotransmission. L'activation des récepteurs NMDA nécessite la liaison du glutamate, mais également celle d'un co-agoniste tel que la glycine ou la D-sérine (Wolosker, 2007). Dans certaines régions cérébrales, il semble que la D-sérine soit le co-agoniste principal des récepteurs NMDA. En effet, au niveau de l'hippocampe ou de l'hypothalamus, la dégradation de la D-sérine entraîne une diminution des courants médiés par les récepteurs NMDA. Ainsi, la libération de la D-sérine permettrait l'activation des récepteurs NMDA dans certaines régions (Mothet et al., 2000; Panatier et al., 2006; Oliet et al., 2008; Oliet and Mothet, 2009). Les récepteurs NMDA étant impliqués dans la plasticité synaptique, cela suggère que les astrocytes, *via* la libération de D-sérine, pourraient intervenir dans ces phénomènes. (figure 29D) (Oliet and Mothet, 2009). En effet, plusieurs études ont mis en évidence l'implication de la D-sérine astrocytaire dans la plasticité à long terme (LTP). Dans ces études, la diminution du taux de D-sérine ou le blocage de l'activité calcique astrocytaire empêchent l'induction d'une LTP (Yang et al., 2003; Henneberger et al., 2010). La D-sérine pourrait également être impliquée dans des phénomènes de métaplasticité. Nous avons décrit précédemment la modification du recouvrement astrocytaire au niveau de l'hypothalamus lors

des phénomènes de lactations. Cette diminution du recouvrement engendre une diminution de la quantité de D-sérine présente, et donc une modification de l'activité des récepteurs NMDA (Panatier et al., 2006).

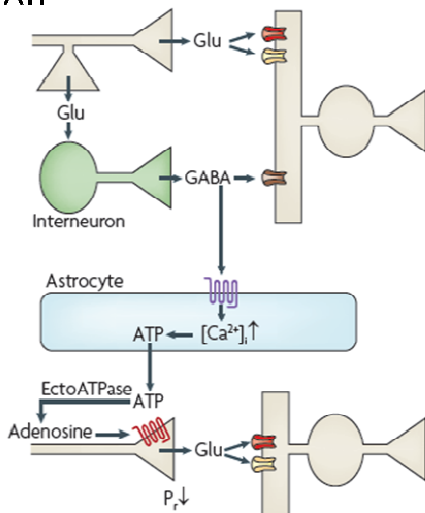
A. Augmentation de l'excitabilité par le glutamate



B. Augmentation de la transmission excitatrice et inhibitrice par le glutamate



C. Dépression hétérosynaptique médiée par l'ATP



D. Modulation de l'activation des récepteurs NMDA par la D-sérine

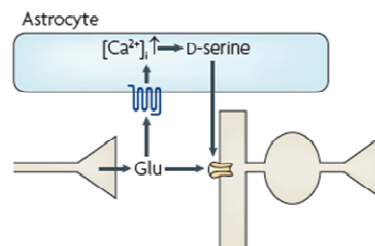


Figure 29. La gliotransmission module la transmission synaptique de différentes façons. Schéma représentatif des différentes modulations exercées par des libérations astrocytaires de glutamate, d'ATP et de D-sérine. A. Le glutamate module l'excitabilité en agissant au niveau post-synaptique. B. En agissant au niveau pré-synaptique, le glutamate module la libération de neurotransmetteurs. C. Exemple de dépression hétérosynaptique : activé par le GABA l'astrocyte libère de l'ATP qui, transformé en adénosine, pourra diminuer la transmission glutamatergique de manière hétérosynaptique. D. La libération de D-sérine par l'astrocyte permet d'activer les récepteurs NMDA. D'après Hamilton & Attwell, 2010.

En conclusion, les astrocytes sont capables d'intervenir de façon active dans la transmission synaptique et de s'adapter à leur environnement neuronal. Certaines de leurs caractéristiques, notamment en termes d'organisation spatiale ou d'excitabilité calcique, diffèrent en fonction de la structure cérébrale observée. En parallèle, leur organisation particulière au sein d'une même structure, en territoires fonctionnels, leur permet d'interagir avec les neurones de façon spécifique. Ces territoires s'organisent de façon hiérarchique et présentent plusieurs niveaux de spécificités, depuis les microdomaines, définissant des compartiments sub-cellulaires au niveau d'un même astrocyte, jusqu'aux macrodomaines regroupant plusieurs territoires astrocytaires. Enfin, grâce à une dynamique spatio-temporelle de leur organisation, les astrocytes sont capables de s'adapter aux conditions environnementales, en remaniant sans cesse le degré de recouvrement synaptique ou leur couplage inter-astrocytaire.

IV.4. Astrocytes et maladie de Parkinson

IV.4.1. Astrocytes et pathologies : généralités

L'importance des fonctions occupées par les astrocytes en condition physiologique sous-entend une implication de ces cellules en conditions pathologiques. En effet, les astrocytes sont impliqués dans pratiquement toutes les pathologies du SNC, où ils occupent des fonctions souvent antagonistes. Ils permettent de lutter contre la pathologie de diverses manières (en limitant les phénomènes excitotoxiques, en produisant des facteurs neurotrophiques ou des agents anti-oxydants). Cependant, à l'inverse, ils participent à l'exacerbation de la pathologie (*via* la production d'agents toxiques, l'induction de l'excitotoxicité par réversion des transporteurs au glutamate...) (Halassa et al., 2007a; Barres, 2008; Chvatal et al., 2008). En conditions pathologiques, les astrocytes sont sujets à diverses modifications, au niveau de l'expression de leurs canaux ioniques, transporteurs, récepteurs, au niveau du couplage inter-astrocytaire ou encore au niveau de leur métabolisme (Seifert et al., 2006). L'une de ces modifications (qualifiée de gliose réactionnelle) consiste en la surexpression de la GFAP et peut s'accompagner d'une prolifération astrocytaire. Ce phénomène peut avoir des effets bénéfiques, comme l'augmentation de la recapture du glutamate ou néfastes comme la perturbation de l'activité neuronale (Wilhelmsson et al., 2006; Barres, 2008; Chvatal et al., 2008; Ortinski et al.).

IV.4.2. Astrocytes et maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson s'accompagne d'une importante activation microgliale et d'une astrogliose au niveau de la SNc, chez l'homme et dans les modèles animaux de la maladie : chez le rat traité à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), la souris ou le singe traité au 1-méthyle 4-phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine (MPTP) (Chadi and Gomide, 2004; Dervan et al., 2004; Gomide and Chadi, 2005; Hirsch et al., 2005; Henning et al., 2008; McGeer and McGeer, 2008; Lu et al., 2011). Une astrogliose a également été mise en évidence au niveau du NST, du

striatum, du GPe et de la SNr chez le rat lésé à la 6-OHDA (Gomide and Chadi, 2005; Henning et al., 2008).

Une fois activées, les cellules microgliales libèrent différents agents, aux rôles bénéfiques et délétères. La production de facteurs neurotrophiques (GDNF, BDNF, MANF pour « mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor ») ou d'agents anti-oxydants, contribue à ralentir la progression de la dégénérescence neuronale. À l'inverse, la production d'espèces réactives de l'oxygène, de cytokines et prostaglandines pro-inflammatoires, exacerbe la maladie (Vila et al., 2001; McGeer and McGeer, 2008).

De même, les astrocytes sont impliqués à la fois dans la protection et dans l'exacerbation de la pathologie. Il a par exemple été montré que ces cellules sont capables de recapter la protéine α -synucléine et de la dégrader (Rappold and Tieu, 2010). Cependant, une étude utilisant un modèle de souris transgénique, exprimant l' α -synucléine de façon spécifique et inducible dans les astrocytes, a montré que cette protéine perturbait l'activité astrocytaire et entraînait un recrutement des cellules microgliales. Les astrocytes de ces souris présentent une diminution de l'expression des transporteurs du glutamate et de la protéine aquaporine 4 au niveau des pieds périvasculaires. Ces modifications altèrent la recapture du glutamate et la régulation de l'homéostasie de l'eau. De plus, l'induction de l'expression de l' α -synucléine dans ces astrocytes s'accompagne d'une perte neuronale, ce qui suggère un rôle des astrocytes dans les mécanismes de dégénérescence neuronale à l'origine de la maladie de Parkinson (Gu et al., 2011). Enfin, chez la souris traitée au MPTP, une étude a mis en évidence une augmentation du taux de D-sérine et de sérine racémase dans les astrocytes, qui pourrait être à l'origine d'une sur-activation des récepteurs NMDA et mener à des phénomènes d'excitotoxicité (Lu et al., 2011).

Des modifications du couplage astrocytaire ont été mises en évidence au niveau du striatum. En effet, chez le rat traité à la roténone, le taux de Cx43 est augmenté, suggérant une augmentation du couplage. Ce phénomène pourrait contribuer au maintien de l'homéostasie du K^+ et de l'eau (en permettant une meilleure distribution du potassium ou de l'eau dans le réseau astrocytaire) mais pourrait également participer aux phénomènes de synchronisations neuronales caractéristiques de la MP (§ III.1.2) (Kawasaki et al., 2009).

Concernant les effets bénéfiques associés aux adaptations astrocytaires, il a été montré qu'une lésion à la 6-OHDA (chez le rat), entraînait une augmentation de la libération de facteurs neurotrophiques comme le FGF2 (fibroblaste growth factor 2), le bFGF (basic fibroblast growth factor) et la protéine S100B (dont l'activité permet de tamponner les excès de calcium intracytoplasmique) (Chadi and Gomide, 2004; Gomide and Chadi, 2005). Enfin, des modifications de la couverture astrocytaire ont été mises en évidence chez le singe traité au MPTP, où le recouvrement des synapses cortico- et thalamo-striatales est augmenté (Villalba and Smith, 2011). Dans cette structure, la maladie de Parkinson s'accompagne d'une diminution de

la densité des épines dendritiques des MSNs et d'une augmentation de l'activité des synapses glutamatergiques cortico- et thalamo-striatales. Dès lors, l'augmentation de la couverture astrocytaire permettrait de limiter les phénomènes d'excitotoxicité au sein de cette structure et favoriserait la stringence de la transmission dans les synapses résiduelles (Villalba and Smith, 2011).

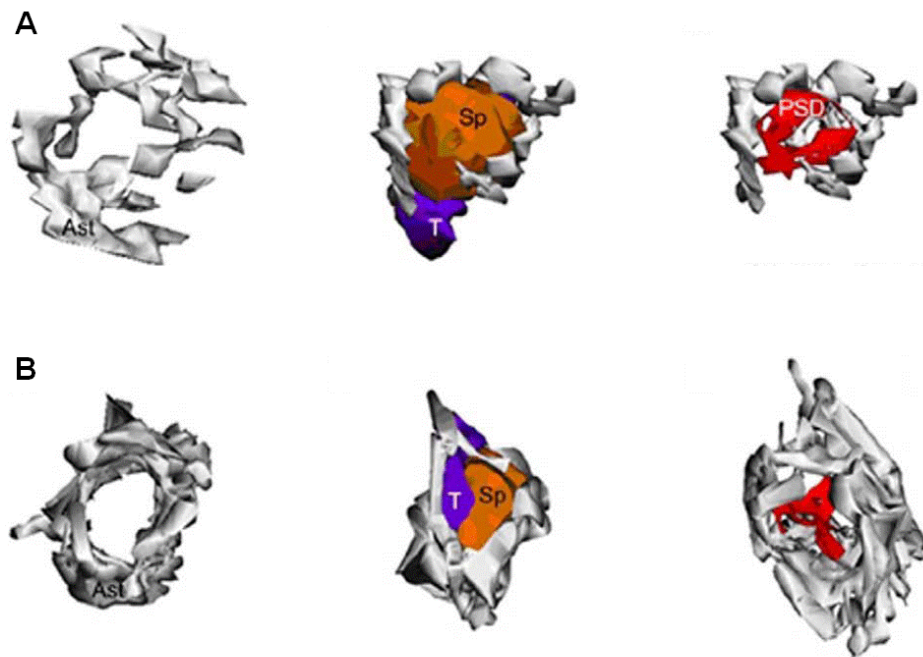


Figure 30: Le recouvrement synaptique astrocytaire est augmenté dans le striatum chez le singe traité au MPTP. Reconstruction en trois dimensions d'une synapse tripartite au niveau du striatum chez un singe normal (A) ou traité au MPTP (B). La synapse formée par une épine dendritique d'un MSN (sp en orange) et la terminaison axonale d'une projection corticale (T en violet) est plus enveloppée par le prolongement astrocytaire (en gris) chez un singe traité au MPTP (B). D'après Villalba and Smith, 2011.

L'ensemble de ces informations suggère que les astrocytes sont impliqués dans certains aspects de la maladie de Parkinson où ils semblent avoir à la fois des rôles protecteurs et néfastes. Cependant, le rôle de ces cellules dans cette pathologie n'est pas encore clairement défini et de nombreuses questions demeurent. Notamment, aucune étude ne fait état de l'implication des astrocytes dans les perturbations des activités neuronales retrouvées dans la maladie de Parkinson.

Objectifs

Dans la partie précédente, j'ai présenté les GB et les différents noyaux qui les composent, en m'intéressant tout particulièrement à la SNr. J'ai décrit le rôle de cette structure ainsi que la nature, l'organisation et les caractéristiques électrophysiologiques de ses neurones. J'ai défini les différents types de modulations permettant de réguler son activité neuronale ainsi que l'importance de cette régulation. En parallèle, j'ai présenté différentes caractéristiques des astrocytes et montré que ces cellules sont impliquées dans la régulation de l'activité neuronale.

Mon travail de thèse se situe à l'interface de ces deux champs d'investigation. En effet, de nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes de régulation de l'activité neuronale de la SNr et cependant, aucune ne fait état du rôle des astrocytes dans cette régulation. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet, qui vise à caractériser les interactions entre les neurones et les astrocytes au sein de la structure de sortie des GB et à mettre en évidence un éventuel rôle régulateur de ces interactions.

Afin d'étudier certains aspects de la communication entre neurones et astrocytes de la SNr, nous avons mis en œuvre des techniques d'imagerie calcique et de patch-clamp. Cela nous a permis d'accéder à la fois aux excitabilités calciques des astrocytes et électriques des neurones de la SNr. Ces deux approches ont été adaptées à un modèle de tranche parasagittale de cerveau de rat, qui permet de conserver l'activité des boucles subthalamo-nigrales excitatrices et pallido-nigrales inhibitrices.

Dans un premier temps, je me suis intéressée aux astrocytes en tant que senseurs de l'activité neuronale. Mon objectif était de répondre aux questions suivantes : quelles sont les caractéristiques des activités calciques de ces cellules? Quels en sont les acteurs ? Comment évoluent ces activités en cas de modification de l'activité neuronale?

Par la suite, j'ai déterminé de quelle manière les astrocytes modulent l'activité neuronale de la SNr. Mon objectif était alors de répondre à deux questions : la recapture astrocytaire joue-t-elle un rôle dans la régulation de l'activité neuronale de la SNr ? L'excitabilité calcique des astrocytes est-elle impliquée dans la modulation de cette activité neuronale?

Matériel et méthodes

J'ai réalisé la majorité de mon travail de thèse à l'Institut des Neurosciences de Grenoble (Inserm U836), au sein de l'équipe « Dynamique et Physiopathologie des Ganglions de la Base ». Cependant, j'ai également effectué une partie de ce travail à Paris, au Collège de France, au sein de l'unité Inserm U667, en collaboration avec le Dr Laurent Venance. Les différentes méthodes utilisées durant ma thèse seront donc décrites ici en deux parties distinctes (I et II) qui respectent ces deux volants de mon travail.

I Etude de l'excitabilité calcique des astrocytes par imagerie calcique confocale

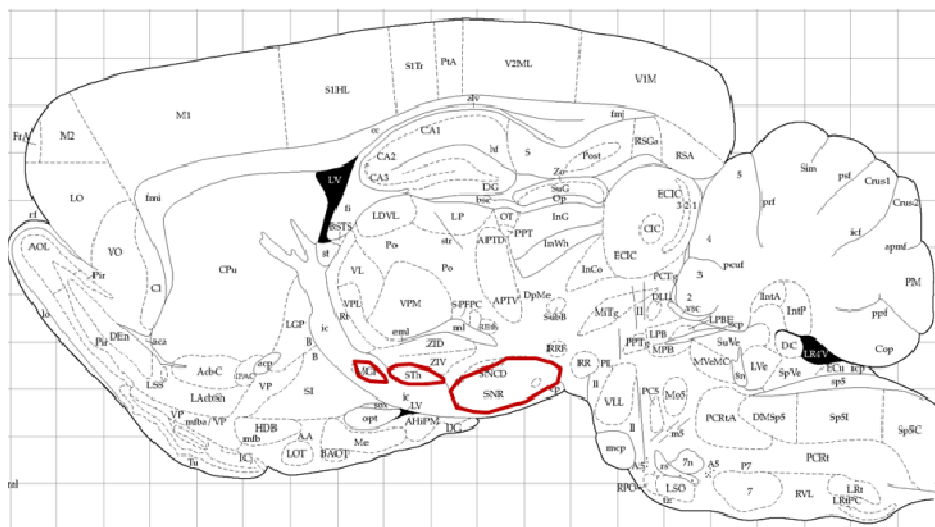
I.1. Modèle expérimental

I.1.1. Modèle animal

Ce travail est réalisé sur des rats de souche Sprague Dawley (Janvier, France) entre le 17^{ème} et le 20^{ème} jour post-natal. Le protocole expérimental a fait l'objet d'une validation par le comité d'éthique de l'Institut des Neurosciences de Grenoble. L'ensemble des expériences a été réalisé en accord avec la directive Européenne de 1986 (86/609/EEC).

I.1.2. Réalisation des tranches parasagittales de cerveau de rat

L'animal est sacrifié par décapitation. Le cerveau est rapidement extrait de la boîte crânienne et placé dans une solution de liquide cérébro-spinal artificiel faible en calcium et riche en magnésium, afin de limiter les phénomènes d'excitotoxicité (ACSF low « Ca^{2+} high Mg^{2+} ») (NaCl, 126 mM; KCl, 2.5 mM; KH_2PO_4 , 1.2 mM; CaCl_2 , 0.5 mM; MgSO_4 , 7 mM; NaHCO_3 , 25 mM; glucose, 11 mM). Un apport constant en carbogène (O_2 95% / CO_2 5%) est assuré durant toute l'étape de réalisation des tranches, afin d'oxygéner les tissus et de maintenir le pH à des valeurs physiologiques. Les deux hémisphères cérébraux sont séparés et placés dans la cuve d'un vibratome (Leica Microsystème VT1200S, Nussloch, Allemagne) contenant la solution d'ACSF « low Ca^{2+} high Mg^{2+} ». Cette cuve est placée dans la glace afin de conserver une température entre 0 et 4°C minimisant ainsi les activités cellulaires, notamment



I.1.3. Vérification de l'intégrité des connexions pallido-nigrales et subthalamo-nigrales dans notre modèle expérimental

82

Deerfield, IL, USA). Les images sont ensuite mises en forme à l'aide du logiciel Adobe Photoshop CS.

I.1.4. Marquages immunohistochimiques des différentes populations cellulaires de la SNr

Afin d'évaluer la proportion de chacune des différentes populations cellulaires présentes dans la SNr, nous avons procédé à divers marquages immunohistochimiques. Cette technique repose sur l'interaction spécifique entre anticorps et antigènes, ensuite révélée par un deuxième anticorps conjugué à un marqueur fluorescent.

Après anesthésie au chloral hydrate (0.5 ml/100 g), les rats (20^{ème} jour post-natal) sont sacrifiés et transfusés en intracardiaque tout d'abord avec 10 ml de PBS 0.1 M puis avec 35 ml de PFA 4%. Le cerveau est alors extrait de la boîte crânienne et post-fixé dans une solution de PFA 4% durant toute une nuit. Le cerveau est ensuite rincé en sucrose 20% (Sigma) et refroidi à -40 °C durant 48 heures. Des tranches sagittales de 20 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat (HM 500 M, Microm, Francheville, France). Les coupes flottantes sont rincées dans du tampon TBS (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl) puis incubées durant 30 minutes dans une solution de saturation contenant 3% de sérum de chèvre (NGS pour « normal goat serum ») dilué dans du TBS-TX (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl, 0.2% Triton X-100), afin de saturer les sites de fixation non spécifiques.

Les coupes sont alors incubées durant une nuit à 4°C sous agitation, avec les anticorps primaires dilués dans la solution de saturation (Table 1).

Anticorps	Cible	Type	Dilution (Fournisseur)
Anti-NeuN	Neurone (protéine nucléaire)	Monoclonal de souris (IgG1)	1/500 (AbCys)
Anti-S100B	Astrocyte (protéine cytoplasmique de liaison au calcium)	Polyclonal de lapin	1/100 (Sigma)
Anti-GFAP	Astrocyte (protéine du cytosquelette)	Polyclonal de lapin	1/1000 (Dako)
Anti-NG2	Cellule NG2 (protéoglycane membranaire)	Monoclonal de souris	1/100 (Millipore)
Ox-42	Cellule microgliale (protéine membranaire du complément CD-11)	Monoclonal de souris (IgG2)	1/100 (AbCys)
Anti-Olig-2	Lignage oligodendrocytaire (facteur de transcription)	Polyclonal de lapin	1/100 (Millipore)

Table 4: Anticorps primaires utilisés pour l'identification des différentes populations cellulaires de la SNr.

Après rinçage au TBS-TX, les coupes sont incubées pendant 2 heures à température ambiante, avec les anticorps secondaires (anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris), couplés à l'Alexa 488 (Molecular Probes) ou à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) et dilués au 1/1000 dans la solution de saturation. Les tranches sont ensuite rincées en tampon TBS puis incubées durant 20 minutes à température ambiante dans du TOPRO-3 iodide (Invitrogen, 1:1000) afin de marquer les noyaux cellulaires. Après rinçage en TBS, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec le liquide de montage Vectashied (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA).

L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un microscope confocal (TCS-SP2 Leica, Deerfield, IL, USA). Les images sont ensuite mises en forme à l'aide du logiciel Adobe Photoshop CS.

I.2.Imagerie calcique

I.2.1.Principe

L'ion Ca^{2+} est un messager ubiquitaire qui se trouve être au premier rang de nombreuses signalisations cellulaires. Les signaux calciques, exprimés par des variations intracellulaires de Ca^{2+} , sont les témoins de nombreuses fonctions cellulaires. La diversité des fonctions imputables au calcium et leur ciblage spécifique sont traduites par un codage spatio-temporel complexe de la signalisation. Les techniques de mesure des mouvements intracellulaires de Ca^{2+} reposent sur l'utilisation d'indicateurs fluorescents capables de chélater le Ca^{2+} libre. La liaison de la sonde au calcium peut avoir différentes conséquences, comme une augmentation

de la fluorescence ou un décalage des longueurs d'onde d'émission ou d'excitation. D'autre part, la détection des augmentations de Ca^{2+} peut se faire de manière qualitative (*via* l'utilisation de sondes non ratiométriques) ou quantitative (*via* l'utilisation de sondes ratiométriques possédant 2 spectres d'excitation ou d'émission en fonction de leur liaison ou non au Ca^{2+}). Dans cette étude, la sonde utilisée, le Fluo-4 AM (Molecular Probes), est une sonde non ratiométrique. Le Fluo-4 est un dérivé du Fluo-3, lui-même dérivant du BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid), un chélateur calcique. Le Fluo-3 et le Fluo-4 présentent des affinités similaires pour le Ca^{2+} (K_d de 325 nM pour le Fluo-3 et 345 nM pour le Fluo-4). Cependant, l'absorption (à une excitation de 488 nm) du Fluo-4 étant plus efficiente que celle du Fluo-3, cela permet de diminuer les concentrations en sondes calciques utilisées et d'avoir un meilleur rendement de fluorescence. De plus, cette génération de sonde calcique est appréciée pour son respect relatif de la dynamique de la signalisation calcique, avec une perturbation relativement faible de la physiologie cellulaire [pour revue voir (Paredes et al., 2008)]. Le Fluo-4 est naturellement hydrophile mais le couplage à un groupement acétoxyméthyl ester (AM) confère une nature hydrophobe à la sonde et lui permet de traverser la membrane lipidique. Dès lors, le clivage du groupement AM par des estérases cytoplasmiques permet de « piéger » la sonde dans le compartiment intracytoplasmique.

I.2.2. Protocole de chargement avec la sonde calcique

Durant l'étape du chargement avec la sonde calcique, les tranches sont placées dans une solution de chargement dont la concentration finale en sonde calcique est de 5 μM . Pour cela le Fluo-4 AM est tout d'abord repris dans un solvant polaire, le diméthylsulfoxyde (DMSO 0.5%) additionné de détergents doux non-ioniques, le crémophor EL (0.0025%) et le pluronic F127 (0.05%). Cette solution est complétée avec de l'ACSF Hepes 10 mM puis soniquée afin de diminuer la taille des micelles formées.

Les tranches de cerveaux sont immergées durant une demi-heure dans cette solution avec un apport en carbogène, à une température de 34°C afin de favoriser l'activité enzymatique des estérases intracellulaires responsables de la désestérification de la sonde. Les tranches sont ensuite placées durant une demi-heure dans une solution d'ACSF enrichie en sodium pyruvate 1 mM, à température ambiante et carboxygénée, pour poursuivre l'étape de désestérification.

I.2.3. Estimation des différents types de populations cellulaires chargées par le Fluo-4 AM

L'imagerie calcique des astrocytes est facilitée par le fait que le Fluo4-AM charge préférentiellement les cellules gliales *in vitro* (Kettunen et al., 2002) et *in vivo* (Hirase et al., 2004). Cependant, afin de nous assurer que le Fluo-4AM charge préférentiellement les astrocytes de la SNr dans nos conditions expérimentales, nous avons réalisé un marquage vital des astrocytes compatible avec le chargement calcique. Pour cela, nous avons utilisé la

sulforhodamine 101 (SR 101) (Sigma-Aldrich), marqueur intra-vital spécifique des astrocytes (Nimmerjahn et al., 2004; Appaix et al., 2012). La sulforhodamine est un analogue de la rhodamine, dérivée du Texas Red. Après injection intraveineuse, la sulforhodamine est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et de diffuser spécifiquement dans les astrocytes, probablement *via* leurs pieds astrocytaires couplés aux vaisseaux sanguins. Les astrocytes étant couplés entre eux *via* des jonctions de type gap, la SR 101 peut diffuser dans tout le réseau astrocytaire. Cette technique de marquage intravital est compatible avec les expériences d'imagerie calcique (Appaix et al., 2012).

La SR 101 est diluée dans une solution saline à une concentration de 10 mg/ml puis injectée par voie intraveineuse (100 μ l/50 g) dans la queue d'un rat préalablement anesthésié à l'isoflurane (dans un mélange gazeux d'air 70% et d'O₂ 30%). Deux heures après l'injection, l'animal est sacrifié par décapitation et des tranches sagittales sont réalisées puis chargées avec la sonde calcique suivant le protocole décrit précédemment. Les tranches, constamment perfusées en ACSF et carboxygénées, sont placées dans la chambre de perfusion d'un microscope bi-photonique (TPLSM 7 MP, Zeiss, Allemagne), équipé d'un objectif à immersion à eau x20 (NA 1.0; Zeiss). La sulforhodamine est excitée à 880 nm avec un laser Ti :Sapphire (Chameleon vision II; Coherent, UK).

Cette technique de marquage nous a également permis de mieux évaluer la population astrocytaire de la SNr. En effet, tous les astrocytes n'expriment pas les protéines GFAP et S100B (Wang and Bordey, 2008; Hewett, 2009). Afin de ne pas sous-évaluer cette population cellulaire au sein de la SNr nous avons donc réalisé le marquage avec la SR 101, en complément de certains immunomarquages.

Les images sont acquises avec le logiciel ZEN 2009 et à l'aide d'une plate-forme motorisée (8 champs de 425 μ m x 425 μ m par SNr présente sur chaque tranche). L'analyse quantitative est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ et des modules complémentaires adaptés (Appaix et al., 2012).

I.3. Dispositif expérimental

I.3.1. Principe et description du dispositif

Les enregistrements d'imagerie calcique sont réalisés à l'aide d'un microscope droit à épifluorescence (Nikon Eclipse E600 FN) disposant d'une lampe à vapeur de mercure (HBO 100W). Les acquisitions se font *via* l'utilisation d'un objectif à immersion à eau x20 (ouverture numérique 0.5). Le microscope est couplé à un système confocal (tête focale C1 Nikon associée au logiciel d'acquisition EZ-C1, Nikon France). La microscopie confocale permet une acquisition en profondeur dans l'échantillon (figure 32). Dans notre cas, les

acquisitions d'imagerie calcique sont réalisées à environ 10 μm sous la surface, ce qui permet de s'affranchir des couches superficielles lésées par la coupe.

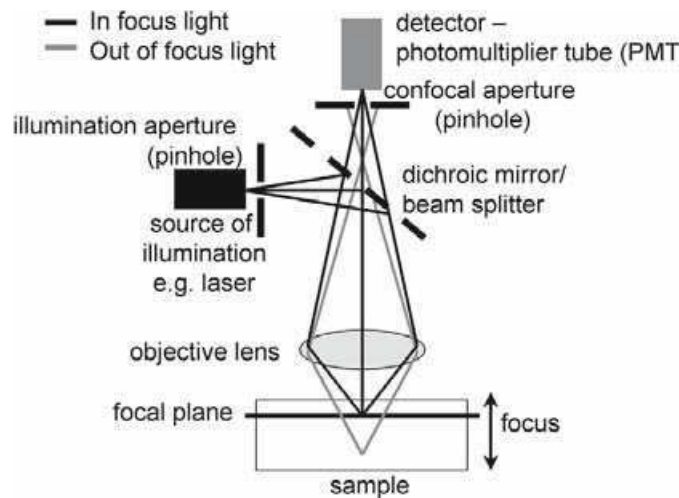


Figure 32: Principe de la microscopie confocale à fluorescence. Le rayon d'excitation est dévié par un miroir dichroïque avant d'exciter les molécules fluorescentes de l'échantillon. La fluorescence émise est détectée par le biais de filtres d'émission et de photomultiplicateurs. La présence de "pinholes" permet de s'affranchir des signaux émis en-deçà et au-delà du plan focal. D'après Tovey et al., 2005.

Notre système est combiné à différents lasers permettant l'excitation d'un large spectre de fluorescence (de 408 à 543 nm). Dans notre étude, le Fluo-4 est excité 488 nm avec un laser argon et l'émission est filtrée à 515 ± 15 nm. La SR101 est excitée à 543 nm avec un laser hélium-néon et l'émission est récoltée à 605 ± 75 nm.

Les tranches sont placées sur la plateforme du microscope, dans une chambre de perfusion permettant de renouveler l'ACSF de manière continue à un débit d'environ 2 ml/min et sous apport constant en carbogène. Les enregistrements d'activité calcique sont réalisés à température ambiante, dans un seul plan focal, avec une vitesse d'acquisition de 1.2 seconde sur 5 minutes (soit 250 images).

I.3.2. Application d'agents pharmacologiques

Différents agents pharmacologiques ont été utilisés afin d'étudier certains acteurs impliqués dans l'activité calcique astrocytaire. Ces agents pharmacologiques sont appliqués dans le bain en perfusion. Les différents agents pharmacologiques utilisés, leurs cibles et les concentrations utilisées sont résumées dans la table 2.

Agent pharmacologique	Effet	Concentration
Glutamate	Neurotransmetteur, agoniste des récepteurs AMPA, kaïnate, NMDA et mGlu	100 μ M
GABA	Neurotransmetteur, agoniste des récepteurs GABA _A , GABA _B , GABA _C	20 μ M
CNQX	Antagoniste des récepteurs AMPA	10 μ M
L-AP3	Antagoniste des récepteurs mGluR du groupe I	100 μ M
AP-5	Antagoniste des récepteurs NMDA	50 μ M
Bicuculline	Antagoniste des récepteurs GABA _A	20 μ M
2-hydroxysaclofen	Antagoniste des récepteurs GABA _B	100 μ M
Tetrodotoxine	Inhibiteur des canaux sodiques dépendants du voltage	500 nM
Thapsigargine	Inhibiteur de la pompe ATPase SERCA	2 μ M

Table 2: Récapitulatif des agents pharmacologiques utilisés dans les études de l'excitabilité calcique astrocytaire

I.3.3. Stimulation électrique du noyau sous-thalamique

La stimulation du NST est réalisée en tranche à l'aide d'une électrode bipolaire concentrique à bout arrondi (platineum/iridium ; Frederick Haer & Co., USA). La stimulation est appliquée durant 5 minutes de manière continue en faisant varier certains paramètres : la durée du stimulus est de 100 μ s, l'intensité varie de 100 à 500 μ A et la fréquence de 10 à 230 Hz. Ces paramètres correspondent à ceux utilisés en clinique humaine, avec des intensités adaptées à la taille du NST de rat (Boulet et al., 2006; Shen and Johnson, 2006). La stimulation est réalisée à l'aide d'un stimulateur ISO-FLEX contrôlé par un Master 8 (A.M.P.I. Jerusalem, Israel). L'intensité de la stimulation est contrôlée à l'aide d'un oscilloscope (HM 205-3, Hameg, France).

I.4. Analyse

L'analyse des différents enregistrements est réalisée grâce au logiciel CalSignal développé par le Dr Jean-Claude Platel (Platel et al., 2007). Ce logiciel permet, après définition des régions d'intérêt (ROIs), de suivre et d'analyser différents paramètres des signaux de fluorescence dans chacune des ROIs. La détection des signaux est effectuée par rapport à une valeur de fluorescence basale F_0 , calculée pour chaque ROIs (sur toute la durée d'enregistrement ou avant l'application d'agent pharmacologique). Les variations significatives de fluorescence ($\Delta F/F_0$) sont alors détectées (seuil de détection fixé à 15%) puis l'amplitude et la durée de ces

signaux sont calculées. Ces données sont ensuite exportées dans SigmaStat (Systat) pour une analyse statistique.

Pour chaque enregistrement, un pourcentage d'astrocytes actifs est calculé par rapport au nombre total d'astrocytes chargés et détectés (ROIs). Lors d'application d'inhibiteurs ou de la stimulation du NST, deux enregistrements successifs de 5 minutes sont réalisés dans la même zone et l'agent (inhibiteur pharmacologique ou stimulation électrique) est appliqué lors du deuxième enregistrement. Le pourcentage de cellules actives durant la seconde acquisition (#2) est alors comparé au premier enregistrement (#1), comme décrit dans la formule ci-dessous :

$$\% \text{ cellules actives} = \frac{\% \text{ cellules actives \#2}}{\% \text{ cellules actives \#1}} \times 100$$

Au préalable, des contrôles sont réalisés : deux enregistrements successifs de 5 minutes sont réalisés (sans aucune application lors du second enregistrement). Dans ce cas, le nombre de cellules actives durant le second enregistrement n'est pas significativement différent de celui du premier enregistrement ($79.5 \pm 7.4\%$ d'activité résiduelle, $p = 0.183$, $n = 18$ tranches). Les paramètres des signaux calciques tels que l'amplitude, la fréquence ou la durée ne sont pas modifiés.

Le pourcentage de cellules actives résiduelles obtenu lors des applications d'inhibiteurs ou lors de la stimulation du NST, est comparé à celui des contrôles.

Les effets des inhibiteurs sur la stimulation sont réalisés de la manière suivante : deux enregistrements successifs de 5 minutes sont réalisés et la stimulation, ainsi que les inhibiteurs sont appliqués durant le second enregistrement. Le pourcentage de cellules actives résiduelles du second enregistrement est comparé au premier et normalisé. Ce résultat est alors comparé aux effets de la stimulation en absence d'inhibiteurs.

Dans cette étude, les résultats sont présentés comme étant des valeurs moyennes \pm sem et les analyses statistiques ont été effectuées par des tests non paramétriques de Mann-Whitney permettant de comparer deux échantillons indépendants.

II Etude de l'activité neuronale par la technique du patch-clamp

II.1. Modèle expérimental

II.1.1. Modèle animal et réalisation des tranches parasagittales

Cette étude a été réalisée sur des rats de la souche OFA âgés de 15 à 22 jours. Les tranches sont également réalisées dans le plan sagittal. Durant l'étape de coupe, les conditions de température et d'apport en carbogène sont identiques à celles décrites dans la partie I. Les tranches sont également réalisées à l'aide d'un vibratome (VT1200S, Leica Microsystèmes, Nussloch, Allemagne). La solution d'ACSF de coupe et de repos est la suivante : NaCl, 125 mM; KCl 2.5 mM; glucose, 25 mM; NaHCO₃, 25 mM; NaH₂PO₄, 1.25 mM; CaCl₂, 2 mM; MgCl₂, 1 mM, enrichie de sodium pyruvate 10 µM. Après la coupe, les tranches sont placées dans cette solution d'ACSF durant 1 heure à 34°C.

II.2. Patch-clamp

II.2.1. Principe

Le patch-clamp est une technique mise au point en 1976 par Erwin Neher et Bert Sakmann, ce qui leur a valu le prix Nobel de Médecine en 1993 (Neher and Sakmann, 1976). Cette technique permet d'enregistrer l'activité des cellules excitables électriquement. Ainsi, elle permet d'enregistrer l'activité de décharge neuronale, les variations de potentiels membranaires, les entrées synaptiques ou encore le courant passant à travers un canal unique. Le principe de la technique repose sur l'utilisation de deux électrodes : l'électrode d'enregistrement et l'électrode de référence. L'électrode d'enregistrement est placée dans une pipette de verre remplie d'un liquide conducteur (dont la composition est proche de celle du milieu intra- ou extra-cellulaire selon les configurations) et l'électrode de référence est placée dans le milieu extra-cellulaire. Les mesures de différences de potentiel entre ces deux électrodes permettent alors de mesurer des courants ou des voltages. La technique s'effectue en différentes étapes (figure 35): la pipette de verre contenant l'électrode d'enregistrement est tout d'abord mise en contact étanche avec la cellule à enregistrer. Cette première étape permet d'obtenir la configuration cellule attachée où les variations de potentiels membranaires peuvent être détectées. Par la suite, la rupture de la portion membranaire située sous la pipette permet d'atteindre la configuration cellule entière, accédant ainsi à tous les mouvements ioniques cellulaires. Dès lors, il est possible de réaliser deux types d'enregistrements : **1)** en imposant un voltage (mode voltage imposé), l'expérimentateur a accès aux différents courants

membranaires; **2)** à l'inverse, le mode courant imposé permet d'enregistrer les variations de potentiels membranaires.

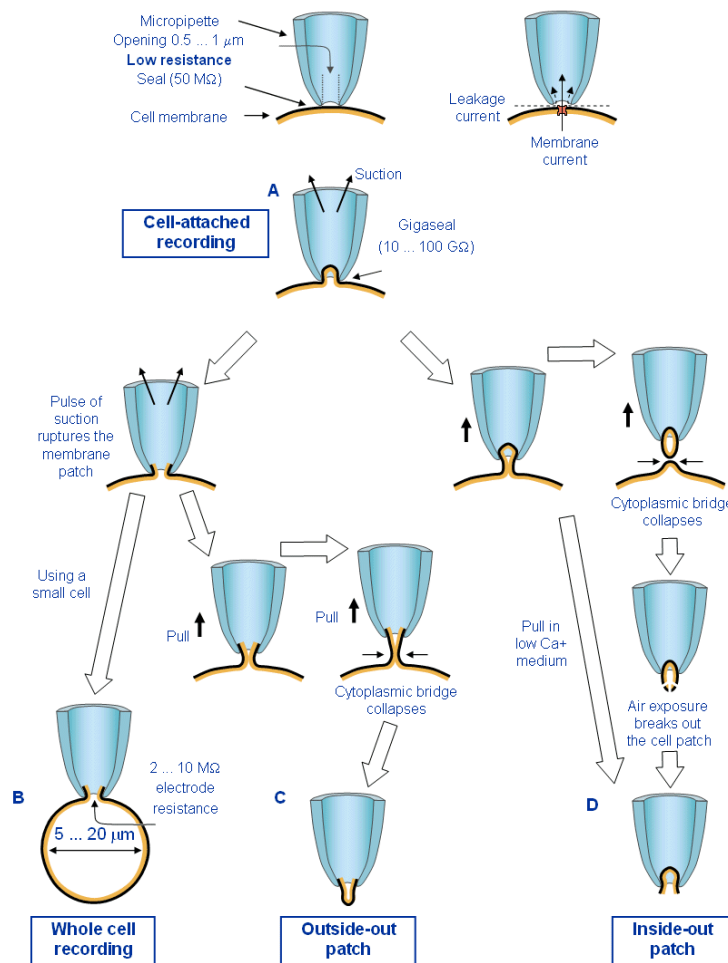


Figure 35: Schéma du principe et des différentes configurations du patch-clamp. Une micropipette de verre, contenant l'électrode dans un milieu conducteur, est placée en contact avec la cellule. Une légère succion permet de rendre ce contact hermétique générant ainsi le mode cellule attachée (A). La rupture du fragment membranaire sous la pipette crée un continuum entre le cytoplasme et le milieu intra-pipette et permet d'accéder au mode cellule entière (B). A ce stade, l'élongation de la membrane permet d'aboutir au mode « outside-out » (C). Le mode « inside-out » est obtenu à partir de la configuration cellule attachée en étirant puis rompant la membrane située sous l'embouchure de la pipette (D). Modifié d'après Hamill et al., 1981.

II.2.2 Dispositif expérimental

Les tranches sont placées dans une chambre perfusée par de l'ACSF et maintenue à 34°C grâce à un contrôleur de température (Badcontroller V, Luigs & Neumann, Ratingen, Allemagne). Les tranches positionnées sous un microscope droit (BX51, Olympus, Rungis, France) et les cellules sont identifiées grâce à un objectif de grossissement x40 à immersion à eau. L'image est ensuite grossie (x2) grâce à une lentille, avant d'être observée en infra-rouge à l'aide d'une caméra CCD (C2400-07, Hamamatsu, Shizouka, Japon).

Les pipettes de patch sont obtenues par étirement de capillaires de verre borosilicaté sans filament (Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) à l'aide d'une étireuse verticale (PIP5, HEKA, Lambrecht, Allemagne). Les pipettes sont remplies avec le milieu intracellulaire approprié ajusté à pH 7.35 avec du KOH et préalablement filtré. Les milieux intracellulaires sont de deux types : le milieu dit « normal » destiné à l'enregistrement de l'activité neuronale (K-gluconate, 105 mM; KCL, 30 mM; phosphocréatine, 10 mM; HEPES, 10 mM; ATP-Mg²⁺, 4 mM; GTP-Tris, 0.3 mM; EGTA, 0.3 mM) et le milieu dit « BAPTA » utilisé pour bloquer l'activité calcique astrocytaire. Dans cette solution, l'EGTA 0.3 mM est remplacé par du BAPTA à 50 mM. Le BAPTA est un chélateur du calcium qui, *via* sa diffusion au sein du réseau astrocytaire couplé par des jonctions de type gap, va permettre un blocage des activités calciques du réseau (Serrano et al., 2006). Les deux solutions intracellulaires sont supplémentées en biocytine 2 mg/ml afin de réaliser des marquages des différentes cellules (neuronales et astrocytaires) patchées. Une fois remplies avec du milieu intracellulaire, les résistances des pipettes sont comprises entre 6 et 9 MΩ avec le milieu « normal » et entre 3 et 4 MΩ avec le milieu « BAPTA ».

Après avoir appliqué une surpression, les micropipettes sont descendues dans le bain d'ACSF et le potentiel de jonction est immédiatement compensé *via* le logiciel d'acquisition PatchMaster 2.32 (HEKA, USA). Les micropipettes sont dirigées à l'aide de micromanipulateurs piézoélectriques (Luigs and Neumann, Allemagne). Après rapprochement, voire contact entre la cellule cible et la pipette, la surpression est levée provoquant ainsi l'adhésion de la membrane à la pipette. Une légère pression négative est alors appliquée afin d'obtenir une jonction étanche entre ces deux constituants. L'augmentation de la résistance de la pipette témoigne de la réussite de cette étape, alors prolongée jusqu'à atteindre une résistance de l'ordre du GΩ.

La capacité électrique de la pipette est alors compensée (compensation de la composante rapide entre 70 et 80%).

Le mode « cellule entière » est atteint par rupture de la portion membranaire située sous la pipette, qui est provoquée en appliquant de brèves pressions négatives. La capacité membranaire ainsi que la résistance de série sont alors compensées.

II.2.3. Acquisition

Les signaux enregistrés en mode potentiel imposé ou courant imposé sont amplifiés à l'aide d'un amplificateur (EPC10-double, HEKA, Lambrecht, Allemagne) et analysés en temps réel par le logiciel PatchMaster 2.32 (HEKA, USA). En mode voltage imposé, les signaux sont filtrés à 5 kHz et échantillonnés à 10 kHz. En mode courant imposé, ils sont filtrés à 2.5 kHz et échantillonnés à 5 kHz.

II.2.4. Identification cellulaire

La différenciation des cellules neuronales versus gliales se fait sur la base de critères morphologiques. Les neurones de projections GABAergiques de la SNr ont un corps cellulaire d'une taille de l'ordre de 20 μm alors que les astrocytes présentent de plus petits corps cellulaires (7-9 μm). Les caractéristiques électrophysiologiques permettent par la suite de confirmer cette identification morphologique. Pour cela, des sauts hyperpolarisants puis dépolarisants sont appliqués afin de définir la relation courant/potentiel des différents types cellulaires. Pour les neurones, la relation courant/potentiel est mesurée en courant imposé par des sauts d'une durée de 500 ms. A chaque saut, un incrément de 10 pA est injecté, à partir d'un saut initial à -150 pA et jusqu'à +50 pA. Pour les astrocytes, la relation courant/potentiel est mesurée en mode voltage imposé par des sauts de 10 mV à partir de -150 mV jusqu'à +90 mV.

II.2.5. Enregistrement de l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr

L'activité de décharge spontanée peut être enregistrée en configuration « cellule attachée » ou « cellule entière ». Dans cette étude les deux configurations ont été utilisées. Les enregistrements en configuration « cellule attachée » ont été réalisés en mode voltage imposé contrairement aux enregistrements en « cellule entière » réalisés en courant imposé. Dans les deux cas le courant injecté était nul ($I=0$) afin de ne pas perturber l'activité neuronale.

II.3. Modification de l'activité astrocytaire : application d'agents pharmacologiques et chélation des mouvements calciques

Afin d'étudier l'impact de l'activité astrocytaire sur l'activité neuronale, nous avons utilisé deux types d'approches permettant de moduler certaines fonctions astrocytaires.

II.3.1. Inhibition de l'activité de recapture astrocytaire

La recapture astrocytaire du glutamate ou du GABA extracellulaire est inhibée par blocage des transporteurs astrocytaires. Les agents pharmacologiques sont appliqués dans le bain, par perfusion. Dans ces conditions, la fréquence de décharge neuronale est tout d'abord enregistrée durant 5 minutes, avant l'ajout de l'agent pharmacologique. Après 15 minutes de perfusion avec l'agent pharmacologique, la fréquence est à nouveau enregistrée durant 5 minutes. La fréquence enregistrée durant les 5 dernières minutes est alors comparée à celle précédant l'application de l'inhibiteur. Les agents utilisés pour bloquer les transporteurs de glutamate et de GABA sont décrits dans le tableau 3.

Agent pharmacologique	Effet	Concentration
Acide di-hydrokaïnique	Inhibiteur des transporteurs du glutamate GLT-1 astrocytaires	300 μ M
Acide nipécotique	Inhibiteur des transporteurs du GABA GAT astrocytaires et neuronaux	500 μ M

Table 3 : Récapitulatif des inhibiteurs de la recapture glutamatergique et GABAergique utilisés.

II.3.2. Diffusion du BAPTA dans le réseau astrocytaire

Le blocage de l'activité calcique astrocytaire est réalisé par application de BAPTA 50 mM *via* la pipette de patch. Le couplage des astrocytes par des jonctions communicantes de type gap permet alors la diffusion du BAPTA dans tout le réseau astrocytaire couplé. L'enregistrement de l'activité neuronale est réalisé de façon concomitante à la mise en place de la chélation. Pour cela, les enregistrements sont réalisés en double patch-clamp. Deux pipettes sont simultanément descendues dans la tranche: l'une contenant le milieu intracellulaire « normal » et l'autre, le milieu « BAPTA ». La paire « astrocyte-neurone » est choisie en fonction de leur proximité (distance inférieure à 200 μ m). Dans un premier temps, les deux cellules sont patchées en mode « cellule attachée ». Dans un deuxième temps, on passe en mode « cellule entière » dans le neurone et l'activité spontanée est mesurée pendant 5 minutes. Le mode « cellule entière » est ensuite atteint dans l'astrocyte afin de permettre la diffusion du BAPTA. Ces deux cellules sont maintenues dans cette configuration pendant au minimum 30 minutes afin de permettre la diffusion du BAPTA dans tout le réseau astrocytaire et d'enregistrer l'activité neuronale simultanément.

II.3.3. Marquage de la biocytine et quantification

La biocytine est dissoute dans la solution intracellulaire à une concentration de 5 mg/ml. Les cellules (neurone et astrocyte) sont gardées en mode « cellule entière » durant 30 minutes afin de permettre la diffusion de la biocytine. En fin d'enregistrement, la tranche est récupérée et placée dans une solution de PFA 4% à 4°C durant une nuit. Les révélations de biocytine ont été réalisées par Anne-Marie Godeheu (technicienne au sein de l'équipe Inserm U667). La biocytine est révélée à l'aide du kit ABC Elite peroxydase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) par incubation durant 2h30 à température ambiante, avec l'avidine (ligand de la biocytine) conjuguée à l'enzyme horseradish peroxydase. Les tranches sont ensuite incubées 8 à 10 minutes en présence de 3-3-diaminobenzidine (DAB, substrat chromogène de la peroxydase) en présence d'eau oxygénée. L'acquisition des images est réalisée par le logiciel « ICS Frame Work » (TRIBVN version 2.9.2. Châtillon, France) qui nous a également permis d'évaluer l'aire du réseau astrocytaire ainsi que celui de la SNr. Les images sont alors traitées

par le logiciel ImageJ afin de réaliser un comptage manuel du nombre d'astrocytes présents dans le réseau.

II.3.4. Etude de l'implication des récepteurs des eCB et de l'adénosine

L'étude de l'implication des récepteurs des eCB de type CB1 et de l'adénosine de type A₁ et A_{2A} a été réalisée *via* une approche pharmacologique. Pour cela, les antagonistes des ces récepteurs (résumés dans la table 4) sont appliqués dans le bain par perfusion. La fréquence de décharge neuronale est préalablement enregistrée durant 5 minutes avant l'ajout de l'inhibiteur, puis de nouveau 20 minutes après l'ajout de l'inhibiteur. La fréquence enregistrée durant les 5 dernières minutes est comparée à celle enregistrée avant l'application de l'agent pharmacologique.

Agent pharmacologique	Effet	Concentration
AM261	Antagoniste des récepteurs des eCB de type CB1	3 μ M
SCH 58261	Antagoniste des récepteurs de l'adénosine de type A _{2A}	50 nM
DCPCX	Antagoniste des récepteurs de l'adénosine de type A ₁	100 nM

Table 4 : Récapitulatif des différents antagonistes des récepteurs utilisés en électrophysiologie.

II.4. Analyse

L'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr est analysée grâce au logiciel Spike2. Dans chacune des conditions (blocage de la recapture, diffusion du BAPTA ou blocage des récepteurs), la fréquence de décharge a été enregistrée durant 5 minutes avant l'application de l'agent pharmacologique. Cette fréquence est alors comparée à celle enregistrée à la fin de l'expérimentation. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes \pm sem et la significativité des variations de fréquences a été analysée en utilisant les tests non paramétriques de Mann Mithney-Wilcoxon pour des échantillons indépendants et celui de la somme des rangs de Wilcoxon pour des échantillons appariés. Lorsque nous avons plus de deux groupes d'échantillons, nous avons appliqué un test ANOVA à un facteur.

Résultats

I La stimulation électrique du noyau sous-thalamique module l'activité calcique des astrocytes de la SNr

1.1. Introduction

Au sein du réseau des ganglions de la base, la SNr occupe une place essentielle puisqu'elle intègre les informations provenant des GB et les transmet au cortex *via* un relais thalamique (Deniau et al., 2007). En raison de leur activité spontanée, les neurones GABAergiques de la SNr exercent une inhibition constante sur les structures efférentes de ce noyau. La transmission d'informations pertinentes vers le thalamus nécessite alors une régulation optimale de l'activité neuronale de la SNr (Zhou and Lee, 2011). Parmi les principales afférences de la SNr, les afférences glutamatergiques, provenant du NST, et GABAergiques, provenant du GPe et du striatum, occupent une place importante dans la régulation de l'activité nigrale. Notamment, la SNr est constamment régulée par des libérations de glutamate et de GABA, en raison de l'activité spontanée du NST et du GPe. Cette balance entre inhibition et excitation permet de lever ou de renforcer l'inhibition exercée par la SNr sur ses cibles et occupe, par conséquent, une place cruciale dans le fonctionnement des GB. Lorsque cette balance est modifiée, cela engendre un dysfonctionnement de l'activité de la SNr et une perturbation de la transmission des informations. C'est notamment le cas lors de la maladie de Parkinson où la balance glutamate/GABA au sein de la SNr est déséquilibrée. Cette perturbation résulte d'une hyperactivité de la voie indirecte combinée à une hypoactivité de la voie directe des GB qui conduisent à une hyperactivité des neurones de la SNr (Obeso et al., 2002). La restauration de l'équilibre au sein de ces différentes voies neuronales permet alors de rétablir l'activité neuronale physiologique de la SNr. Cette restauration est permise par les différentes thérapeutiques de la maladie de Parkinson, de nature médicamenteuse ou chirurgicale. Concernant la SHF du NST chez le rat, celle-ci permet de rétablir la balance

glutamate/GABA au sein de la SNr, en activant à la fois les fibres subthalamo- et pallido-nigrales (Windels et al., 2005; Deniau et al., 2010).

De nombreuses études se sont intéressées à l'activité neuronale de la SNr chez le rat et ont décrypté les mécanismes neuronaux impliqués dans la régulation de cette activité. Pourtant, en dépit d'un grand nombre d'études concernant la régulation physiologique, la dérégulation liée à la MP ou la restauration de l'activité de la SNr *via* la SHF du NST, l'implication des astrocytes dans ces régulations n'a jamais été investiguée.

A l'heure actuelle, les astrocytes sont considérés comme des partenaires importants des neurones, impliqués de façon active dans l'activité neuronale. L'expression de récepteurs aux neurotransmetteurs et neuromodulateurs leur permet d'être activés lors d'une transmission synaptique et les phénomènes de recapture ou/et de gliotransmission leur permet d'agir en retour sur cette transmission. La plupart de ces propriétés repose sur des variations intracellulaires de calcium conférant leur excitabilité aux astrocytes. Au vu de l'importance des fonctions astrocytaires dans la modulation de l'activité neuronale, il nous a semblé important d'investiguer le rôle de ces cellules dans la régulation de l'activité neuronale de la SNr.

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés à l'excitabilité calcique des astrocytes et à sa modulation par le compartiment neuronal. Plus précisément, nous avons étudié de quelle manière les astrocytes de la SNr étaient sensibles à leur environnement (notamment à leur environnement chimique dépendant des neurotransmetteurs libérés dans la SNr) en condition physiologique et lors de modulation de la balance glutamate/GABA.

Afin d'étudier les activités calciques des astrocytes dans ces différentes conditions, nous avons développé une technique d'imagerie calcique confocale qui nous a permis de détecter et de mesurer les variations de calcium intracellulaire dans environ 80% des astrocytes de la SNr. Nous avons travaillé sur des tranches aigües parasagittales de cerveau de rat qui nous ont permis de conserver les afférences subthalamo-nigrales et pallido-nigrales ainsi que les libérations spontanées de glutamate et de GABA dans la SNr. Afin de moduler la balance GABA/glutamate, nous avons eu recours à la SHF du NST. Appliquée sur des tranches aigües de cerveau de rat et en condition physiologique, cette stimulation entraîne à la fois des libérations de glutamate et de GABA dans la SNr (Bosch et al., 2011). Ceci nous a permis d'étudier l'impact d'une modification de la balance excitation/inhibition sur l'activité calcique des astrocytes de la SNr.

1.2. Article scientifique

Subthalamic Nucleus Electrical Stimulation Modulates Calcium Activity of Nigral Astrocytes

Elodie Barat^{1,2}, Sylvie Boisseau^{1,2}, Céline Bouyssières^{1,2}, Florence Appaix^{1,2}, Marc Savasta^{1,2,3}, Mireille Albrieux^{1,2*}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U 836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe Dynamique et Physiopathologie des Ganglions de la Base, Grenoble F-38043, France, **2** Université Joseph Fourier, Grenoble F- 38042, France, **3** Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, BP217, Grenoble F-38043, France

Abstract

Background: The substantia nigra pars reticulata (SNr) is a major output nucleus of the basal ganglia, delivering inhibitory efferents to the relay nuclei of the thalamus. Pathological hyperactivity of SNr neurons is known to be responsible for some motor disorders e.g. in Parkinson's disease. One way to restore this pathological activity is to electrically stimulate one of the SNr input, the excitatory subthalamic nucleus (STN), which has emerged as an effective treatment for parkinsonian patients. The neuronal network and signal processing of the basal ganglia are well known but, paradoxically, the role of astrocytes in the regulation of SNr activity has never been studied.

Principal Findings: In this work, we developed a rat brain slice model to study the influence of spontaneous and induced excitability of afferent nuclei on SNr astrocytes calcium activity. Astrocytes represent the main cellular population in the SNr and display spontaneous calcium activities in basal conditions. Half of this activity is autonomous (i.e. independent of synaptic activity) while the other half is dependent on spontaneous glutamate and GABA release, probably controlled by the pace-maker activity of the pallido-nigral and subthalamo-nigral loops. Modification of the activity of the loops by STN electrical stimulation disrupted this astrocytic calcium excitability through an increase of glutamate and GABA releases. Astrocytic AMPA, mGlu and GABA_A receptors were involved in this effect.

Significance: Astrocytes are now viewed as active components of neural networks but their role depends on the brain structure concerned. In the SNr, evoked activity prevails and autonomous calcium activity is lower than in the cortex or hippocampus. Our data therefore reflect a specific role of SNr astrocytes in sensing the STN-GPe-SNr loops activity and suggest that SNr astrocytes could potentially feedback on SNr neuronal activity. These findings have major implications given the position of SNr in the basal ganglia network.

Citation: Barat E, Boisseau S, Bouyssières C, Appaix F, Savasta M, et al. (2012) Subthalamic Nucleus Electrical Stimulation Modulates Calcium Activity of Nigral Astrocytes. PLoS ONE 7(7): e41793. doi:10.1371/journal.pone.0041793

Editor: David I. Finkelstein, The Mental Health Research Institute of Victoria, The University of Melbourne, Australia

Received: March 6, 2012; **Accepted:** June 25, 2012; **Published:** July 27, 2012

Copyright: © 2012 Barat et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding provided by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Université Joseph Fourier; France Parkinson; Fondation de France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mireille.albrieux@ujf-grenoble.fr

Introduction

The pars reticulata of the substantia nigra (SNr) is the main output nucleus of the basal ganglia network and conveys the final output signal to the thalamus and brain stem [1]. The GABAergic neurons of the SNr are tonically active and display spontaneous activity (around 10 Hz) that is partially independent of synaptic inputs [2]. Thus, the brain areas receiving inputs from the basal ganglia are, by default, under strong tonic inhibition. Brief changes in firing, often associated with movement, result in the disinhibition or further inhibition of the target nuclei neurons [3]. The SNr may therefore be considered as a gateway in the transmission of information to the motor and cognitive systems. This output nucleus mostly integrates inputs from the striatum, the external segment of globus pallidus (GPe) and the subthalamic nucleus (STN). Among its inputs, the excitatory STN and the inhibitory GPe play a particularly important role in the regulation of SNr activity as they form a feedback system engaged in synchronized bursting and constituting a basal ganglia pacemaker [4]. The STN

occupies a crucial position in the functional architecture of the basal ganglia network since it is the only glutamatergic nucleus [5,6]. Abnormal hyperactivity of the STN, consecutive to the loss of dopaminergic cells in the substantia nigra pars compacta, is thought to play a critical role in the expression of Parkinson's disease symptoms [7,8]. High-frequency stimulation of the STN (STN-HFS) is currently the main surgical therapy for treatment of advanced Parkinson's disease. The cellular mechanisms of STN-HFS are still debated but it has been proposed that HFS could inactivate STN neurons [9,10] or change their abnormal firing mode into recurrent bursting activity [11]. This normalization could reduce the hyperactivity of basal ganglia output structures, such as SNr [12,13,14]. STN-HFS may produce these effects by activating the axons of STN neurons, STN afferents or fibers passing close to the stimulation site, leading to both glutamate and GABA release within SNr [15,16,17]. As the final stage of information processing within the basal ganglia occurs mainly in the SNr, studying the regulation of the activity of this nucleus in

physiopathological conditions is of major importance [18]. SNr properties for integrating neuronal network and signal processing of the basal ganglia are relatively well known but, paradoxically, the role of astrocytes in the regulation of SNr activity has never been studied.

Over the past decade, the dogma that astrocytes play a subsidiary role in the nervous system has become obsolete. Astrocytes are now viewed as active components of neural networks, as they are endowed with a great variety of voltage and ligand-operated ion channels [19]. An increasing body of evidence obtained the last few years has established the concept of the tripartite synapse, in which astrocytes play an active role by exchanging information with the synaptic elements [20,21] concomitantly with classical homeostatic roles. This concept is based on the demonstration that astrocytes display a form of excitability based on intracellular calcium variations [22]. Neurotransmitters, such as glutamate and GABA, activate receptors on astrocytes [20,23,24,25] generating calcium transients that propagate within the astrocyte population. In particular conditions [26], this increase in astrocytic calcium levels can induce the release of neuroactive substances, such as glutamate, ATP [20,23] or D-serine [27,28]. These gliotransmitters may modulate neuronal excitability [29,30,31] and the strength of synaptic transmission [20,23,32]. The general importance of bidirectional communication between astrocytes and neurons throughout the brain prompted us to study its specific contribution to SNr neuronal activity.

In order to address the role of astrocytes in the regulation of the SNr neuronal activity, we characterized SNr astrocyte excitability and its modulation by the GABA/glutamate balance regulated by the pallido-nigral and subthalamo-nigral loops. We developed a sagittal rat brain slice that (i) conserves the STN-GPe-SNr functional loops, (ii) allows physiological modulation of the activity of the loops and of GABA/glutamate balance within the SNr by stimulating the afferent nuclei. We found that SNr astrocytes displayed spontaneous calcium activity in basal conditions. This calcium activity was partly autonomous and partly dependent on the spontaneous release of GABA and glutamate. Interestingly, disturbing the glutamate/GABA balance by STN-HFS affected the SNr astrocytic calcium activity. These results suggest a specific interaction between neurons and astrocytes within SNr, modulated by the balance between excitation and inhibition.

Results

Preservation of STN-GPe-SNr pathways in rat sagittal brain slices

The pallido-nigral and subthalamo-nigral loops have a crucial influence on the spontaneous activity of SNr neurons and we wondered about their impact on astrocyte activity. The adult rat brain atlas suggested that these nuclei were present on the same sagittal plane, from 2.4 to 2.9 mm laterally to the midline, in adult rat (Fig. 1A) [33]. We performed such sagittal brain slices and introduced lipophilic tracers (DiI crystals) into the SNr or the STN to confirm that the subthalamo-nigral and pallido-nigral pathways were indeed preserved. The dye diffused for four weeks, resulting in retrograde and anterograde labeling of the persistent subthalamo-pallido-nigral pathways. When a crystal was placed in the SNr (Fig. 1B), bundles of labeled fibers could be seen coursing from the SNr towards the STN and probably also towards the GPe because some of these fibers forked close to or within the STN [34] (Fig. 1C). We also detected some labeled soma within the STN (Fig. 1C, inset) meaning that at least some projecting STN neurons were intact. When a crystal was placed in the STN, two pathways

running in opposite direction were observed, one in the rostrocaudal direction and the other one (usually more intense) in the caudorostral direction, suggesting connections towards SNr and GPe respectively (not shown). These observations confirmed that the glutamatergic subthalamo-nigral pathway and the GABAergic pallido-nigral pathway were, at least partly, preserved in these slices.

On acute slices, incubation with propidium iodide and Hoechst 33342 showed that $80 \pm 5\%$ of the SNr cells were still alive 5 hours after slicing ($n = 16$ slices). Electrophysiological experiments were carried out to record the typical pace-maker activity of nigral GABAergic and dopaminergic neurons [2] in these sagittal slices ($n = 15$ neurons in a total of 7 slices). Patch-clamp recordings performed in sagittal plane by other groups had already shown that SNr neurons were affected by a complex pattern of excitatory glutamatergic and inhibitory GABAergic synaptic currents [34,35]. Thus, in these conditions, GABAergic pallidal activity, glutamatergic STN activity and/or GABAergic intranigral activity may potentially contribute to the basal calcium activity of astrocytes in the SNr.

Astrocytes constitute the main cell population in the SNr

The SNr contains two types of neurons: GABAergic and dopaminergic neurons [2]. GABAergic neurons predominate (about 90% of SNr neurons, [36]), forming the major output from the basal ganglia [37]. With an average of 1795 ± 358 total cells/mm² ($n = 7$ slices from 3 rats, estimated by nuclei staining with TO-PRO 3) throughout the whole SNr, immunohistochemical stereological analysis showed that neurons (as revealed by NeuN immunostaining) were heterogeneously distributed within the SNr and accounted for $12 \pm 3\%$ of total SNr cells (Fig. 2A; $n = 16$ tissue sections from 4 rats). When we quantified the astrocyte population with S100B immunostaining, we found $42 \pm 3\%$ of S100B-positive cells in the SNr (Fig. S1A; $n = 6$ tissue sections from 2 rats). As described in other brain structures [38,39], however, we observed that S100B or GFAP are not co-expressed in all astrocytes within the SNr (e.g. $15 \pm 5\%$ of S100B-positive cells were GFAP-positive and $51 \pm 3\%$ of GFAP-positive cells were S100B-positive, $n = 3$ slices; Fig. S1B). Thus, this cell population might be underestimated on the basis of immunostainings. We therefore used an alternative strategy to precisely and specifically determine the proportion of astrocytes in the SNr. Intravital sulforhodamine dyes are known to be specifically targeted to the astrocyte population when injected intravenously in rats [40,41]. Sulforhodamines cross the blood brain barrier and astrocytes are stained directly via their endfeet. We then achieved sagittal living brain slices and loaded them with intravital Hoechst 33342. Sulforhodamine 101 (SR101) staining showed astrocytes to be uniformly distributed throughout the SNr (Fig. 2B) with similar morphology when compared to S100B immunostaining (Fig. S1A). We found that SR101-stained astrocytes accounted for $65.0 \pm 7.2\%$ of total SNr cells ($n = 6$ slices from 3 rats; 48 fields; Fig. 2C).

A major advantage of SR101 staining is that it can be combined with Fluo-4 AM loading in acute living slices for calcium imaging. Thus, we showed that among these SR101-stained astrocytes, $76.2 \pm 6.6\%$ were loaded with Fluo-4 ($n = 6$ slices from 2 rats; Fig. 2D). Moreover, in our conditions, $98.0 \pm 2.2\%$ small (less than 10 μ m) Fluo-4 loaded cells were astrocytes (SR101 stained cells; $n = 6$ slices from 2 rats; Fig. 2D), indicating that almost all the cells subsequently recorded were astrocytes. Microscopic analysis of the Fluo-4 labeled slices confirmed that, compared to neurons, the astrocyte cell bodies were smaller and more strongly labeled by Fluo-4, probably due to their greater ability to take up or

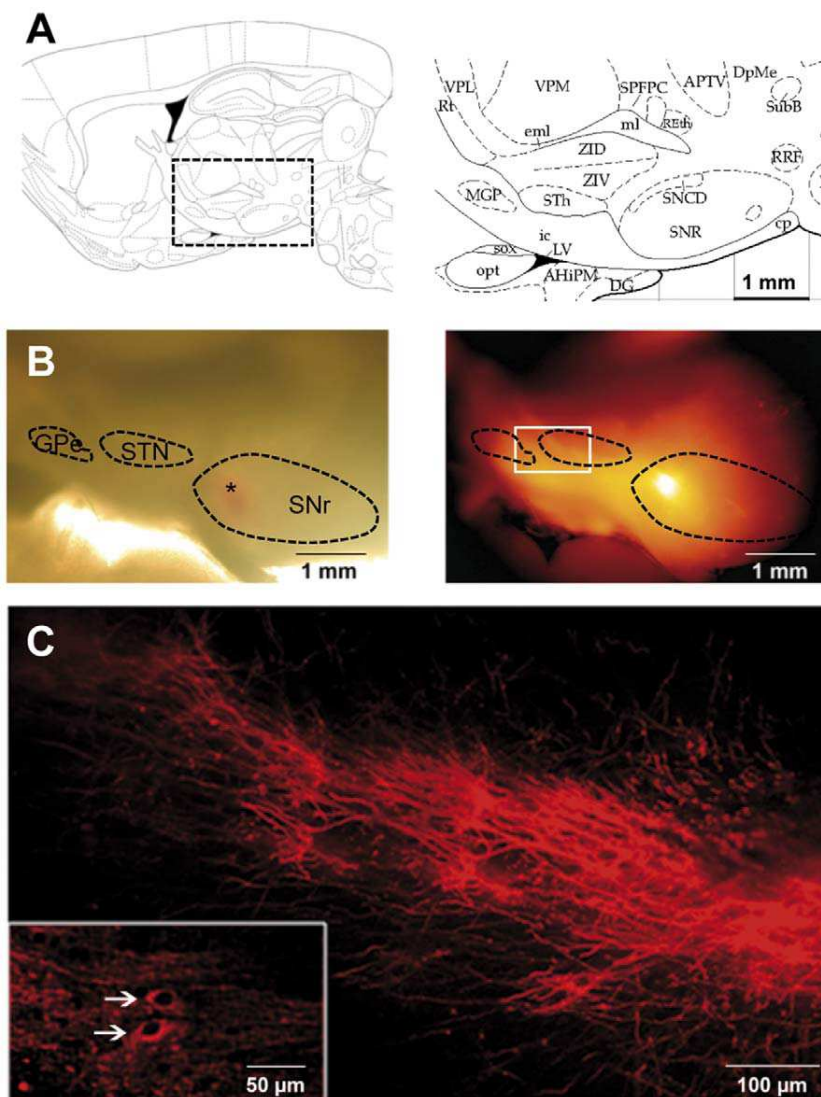


Figure 1. Subthalamo-nigral and pallido-nigral anatomic connections are preserved in sagittal slices. (A) Schematic diagram of the area of interest (right panel) in a sagittal brain slice (left panel, modified from [33]) showing the location of the STN (indicated as STh), GPe (MGP) and SNr (SNr). (B) A Dil crystal was placed in the SNr (depicted by the asterisk in the bright field image, left part) and the slice was incubated for 4 weeks at room temperature. Dil diffused towards STN and GPe (epifluorescence image on the right). (C) Higher magnification of the region indicated by the white rectangle on image B showing subthalamo-nigral and pallido-nigral projections. In some cases, Dil tracing showed retrograde labeling of some cells in the STN (inset, white arrows).
doi:10.1371/journal.pone.0041793.g001

hydrolyze AM-ester dyes. This allowed us to distinguish between the two cell populations on morphological criteria, as already reported for mouse cortex [42].

The remaining SNr cells corresponded to other glial cell populations and were composed of $10 \pm 3\%$ NG2 positive cells ($n = 5$ tissue sections from 2 rats), $13 \pm 4\%$ oligodendroglial-derived lineage cells (Olig 2 immunostainings; $n = 10$ tissue sections from 3 rats) and $7 \pm 4\%$ microglial cells (Ox-42 immunostainings; $n = 6$ tissue sections from 3 rats).

Astrocytes display spontaneous calcium activities in physiological conditions

In order to assess the impact of astrocytes on SNr output activity, we first recorded spontaneous calcium activity using calcium imaging on rat sagittal brain slices at the subthalamo-

pallido-nigral level. On average, individual movies (field of view around $600 \times 300 \mu\text{m}$) included 66.3 ± 15.3 astrocytes ($n = 54$ slices; neurons were excluded on the basis of morphological criteria). In basal conditions, $30.8 \pm 14.5\%$ of the SNr dye-loaded astrocytes displayed spontaneous calcium activity during a five-minute recording period (Fig. 3A–D; $n = 54$ slices from 29 animals, 3330 cells). This proportion increased with the recording period (64% astrocytes displayed calcium activity when observed for a 30 minute-period, Fig. 3E) suggesting that most of astrocytes display spontaneous activity. In active astrocytes, the calcium signal had a mean duration of 23.5 ± 6.8 s with a mean amplitude of 0.19 ± 0.06 ($\Delta F/F_0$, arbitrary units). It occurred at a frequency of 0.37 ± 0.07 event/min ($n = 54$ slices, 3330 cells). Synchronous activity was observed in 2.6% spontaneous active astrocytes.

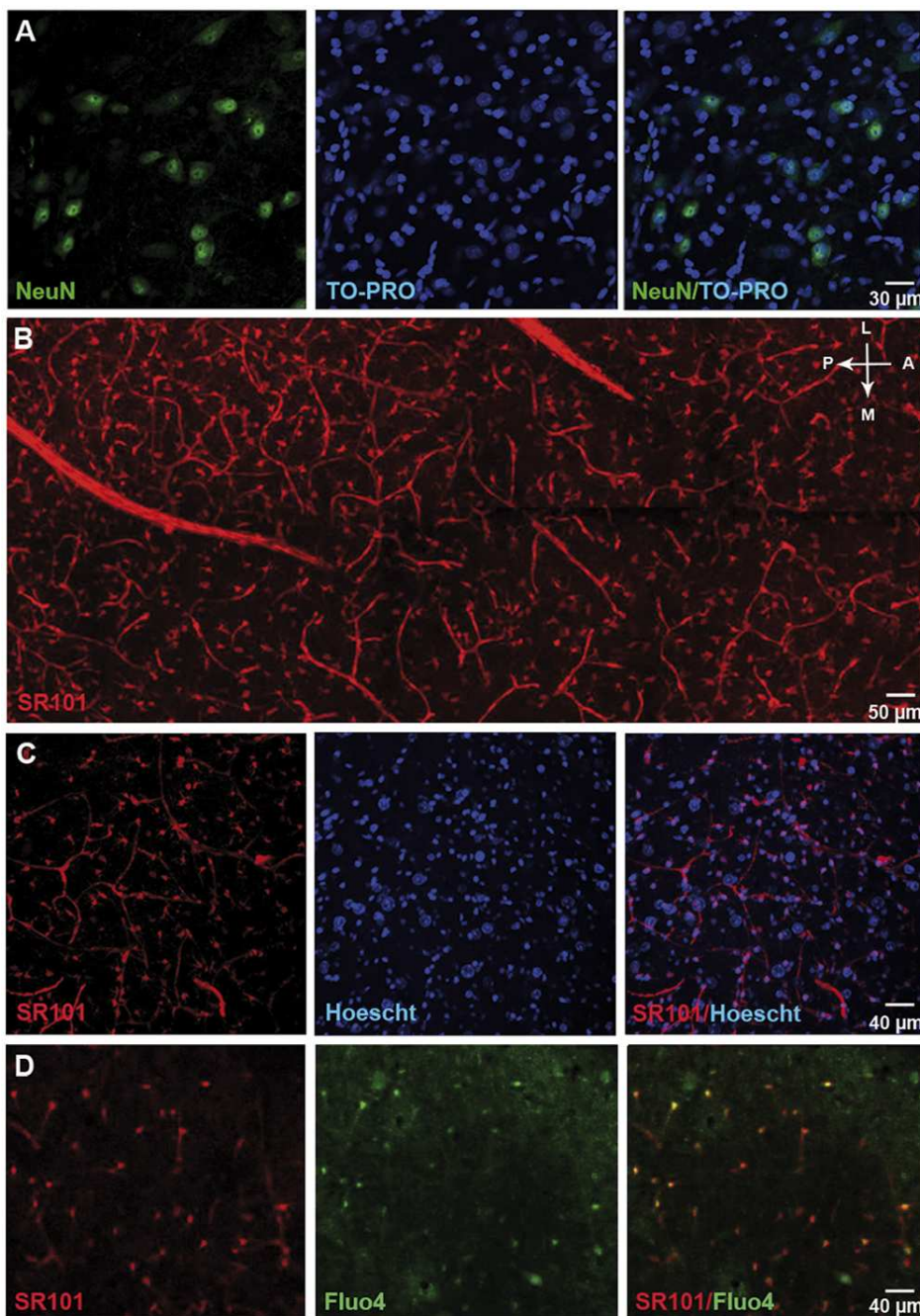


Figure 2. Characterization of SNr cell populations and Fluo-4 loaded cells. (A) NeuN staining (green) labels few cells within SNr. Nuclei are identified by TO-PRO staining (blue). Merged image showing the proportion of neurons within the SNr (right panel). (B) Two-photon multistack (40 slices at 2 μm spacing) mosaic reconstruction of SNr astrocytes and vessels in an acute brain slice 2 h after sulforhodamine 101 (10 mg/ml) intravenous injection (100 μl/50 g body weight). Antero-posterior (AP) and medio-lateral (ML) orientations are shown in the upper right part of the figure. (C) Bi-photon imaging of sulforhodamine 101 (red) and Hoescht 33342 (blue) in the SNr. Merged image showing the proportion of astrocytes within the SNr (right panel). (D) Representative confocal images of SR101-labeled (red) and Fluo-4-loaded (green) cells in the SNr of a sagittal acute slice of rat brain. Merged image showing sulforhodamine 101 and Fluo-4 staining within the SNr, confirming that most of the loaded cells are astrocytes.

doi:10.1371/journal.pone.0041793.g002

We assessed the autonomous part of spontaneous calcium activity recorded in astrocytes (*i.e.* independent of neuronal activity) by incubating slices with tetrodotoxin (TTX, 500 nM) to block neuronal transmission. The effect of TTX was analyzed on a 5 minute recording and compared to a previous recording of

calcium activity performed in the same area just before treatment. The inhibitory effect was then compared to a control experiment, performed in the same conditions but without drugs, and normalized. In presence of TTX, the proportion of astrocytes displaying spontaneous activity was significantly lower

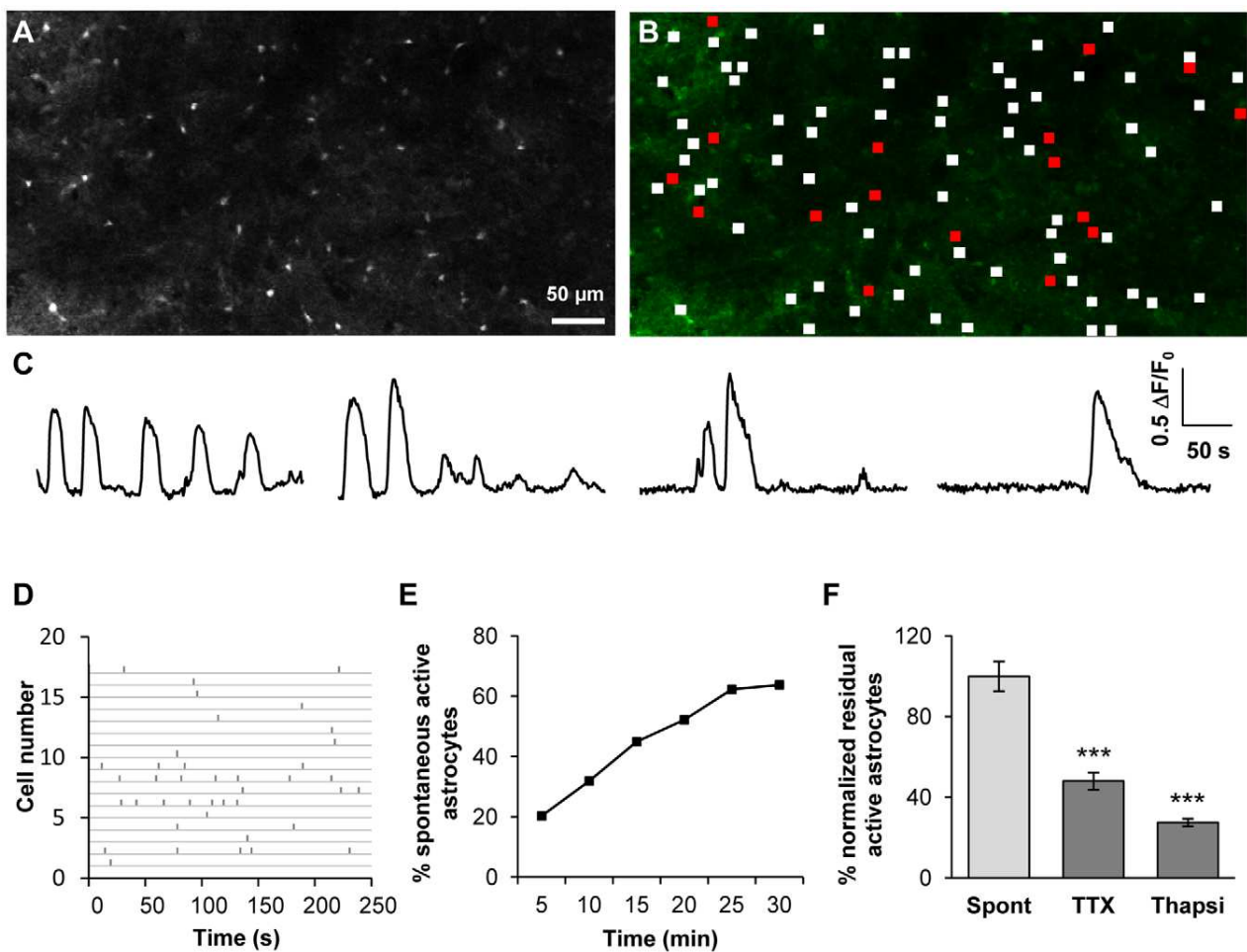


Figure 3. SNr astrocytes display spontaneous calcium activity that is partly dependent on neuronal activity. (A) Fluo-4 loaded cells in the SNr area of a rat sagittal acute slice. Only small cells (astrocytes, less than 10 μm in diameter) were loaded. GABAergic and dopaminergic neurons (with cell bodies from 20 to 40 μm in diameter [70]) were not labelled in most cases. (B) Distribution of active (red frames) and non active (white frames) ROIs within the slice shown in A. (C) Example of typical fluorescence variations recorded in four SNr astrocytes. (D) Raster plot of fluorescence peaks detected in active ROIs described in B. (E) Example of the cumulative progress of the proportion of active astrocytes during recording over 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes. (F) Effect of 500 nM TTX ($n=13$ slices; $p<0.001$) or 2 μM thapsigargin (Thapsi, $n=7$ slices; $p<0.001$) on the spontaneous calcium activity of astrocytes in the SNr. doi:10.1371/journal.pone.0041793.g003

($52.0\pm9.9\%$ inhibition; $p<0.001$; $n=13$ slices from 10 rats, 908 cells; Fig. 3F) indicating that astrocytic calcium activity partially depends on neuronal activity. In the residual active astrocytes, TTX had no effect on calcium activity parameters (such as frequency, duration and amplitude) suggesting that this remaining calcium activity is totally independent of neuronal activity. Moreover, a separate analysis of TTX-sensitive and TTX-insensitive cells performed in the first recording movie (*i.e.* without TTX) revealed no obvious difference in the pattern of calcium signaling between these two sub-populations. As in basal conditions, no synchrony between active cells was observed in the presence of TTX.

Incubation of slices with thapsigargin (2 μM during 30 minutes; a Ca^{2+} store depleting agent) significantly decreased the number of active astrocytes ($72.4\pm9.1\%$ inhibition; $p<0.001$; $n=7$ slices from 5 rats; 738 cells; Fig. 3F). This suggests that Ca^{2+} stores constitute the main route for the astrocytic calcium activity but extracellular Ca^{2+} source may also be involved.

These data provide the first evidence of spontaneous calcium activity in the astrocytes of the SNr in basal conditions. Half of this spontaneous activity is autonomous; the other half depends on neuronal activity.

Glutamate and GABA receptors mediate calcium signals in SNr astrocytes

The most widely accepted mechanism for astrocytic Ca^{2+} increase is dependent on G protein-coupled metabotropic receptors that leads to release of intracellular InsP_3 -activated Ca^{2+} stores [43]. Alternatively, extracellular Ca^{2+} may enter the cell through ionotropic receptors (e.g. glutamate receptors) or voltage-gated calcium channels [19]. Given the large amounts of glutamate and GABA released within the SNr, we first characterized the receptors and channels expressed by SNr astrocytic cells, by applying glutamate and GABA (leading to a calcium rise in glial cells since its action on GABA_A receptors leads to a membrane depolarization in these cells [44]). Bath applications of glutamate (100 μM) induced a calcium increase in $59.3\pm8.8\%$

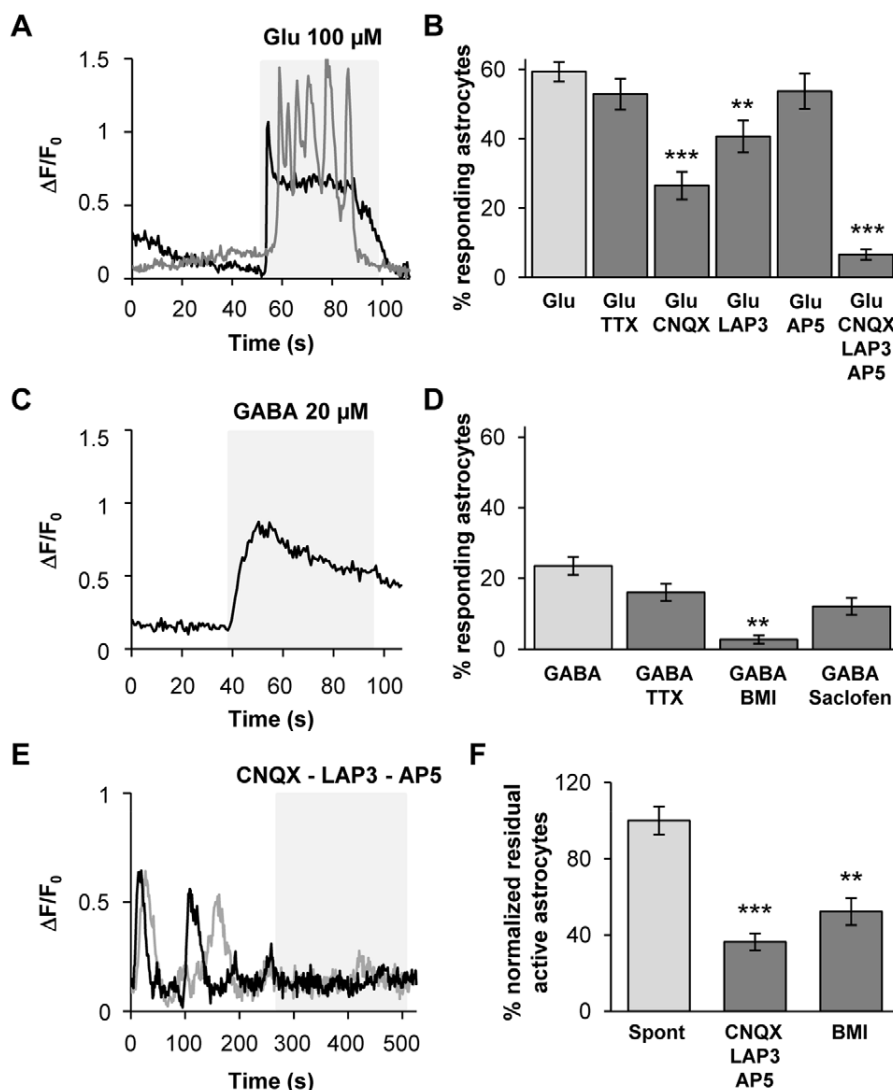


Figure 4. SNr astrocytes AMPA, mGlu and GABA_A receptors are involved in calcium spontaneous activity. (A) Example of two typical fluorescence variation profiles recorded in SNr astrocytes when 100 μ M glutamate was perfused in the bath. (B) Histogram of the percentage of loaded SNr astrocytes responding to the application of 100 μ M glutamate ($n=15$) and the effect of 500 nM TTX ($n=12$; $p=0.317$), 10 μ M CNQX ($n=8$; $p<0.001$), 100 μ M LAP-3 ($n=11$; $p=0.005$), 50 μ M AP-5 ($n=4$; $p=0.453$) or a cocktail containing 10 μ M CNQX+100 μ M LAP-3+50 μ M AP-5 ($n=4$; $p=0.001$) on this glutamate-induced effect. (C) Typical fluorescence variations recorded in a SNr astrocyte when 20 μ M GABA was perfused in the bath. (D) Histogram of the percentage of loaded SNr astrocytes responding to the application of 20 μ M GABA ($n=18$) and the effect of 500 nM TTX ($n=7$; $p=0.215$), 20 μ M BMI ($n=7$; $p=0.02$) or 100 μ M saclofen ($n=8$; $p=0.948$) on this GABA-induced effect. (E) Typical fluorescence variations recorded in two SNr astrocytes before and after incubation with a cocktail containing 10 μ M CNQX+100 μ M LAP-3+50 μ M AP-5. (F) Histogram showing the effect of a cocktail containing 10 μ M CNQX+100 μ M LAP-3+50 μ M AP-5 ($n=10$; $p<0.001$) or 20 μ M BMI ($n=7$; $p=0.003$) on the spontaneous calcium activity of astrocytes in the SNr. The inhibitory effect is normalized with respect to control residual activity. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ and ***, $p<0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0041793.g004

SNr astrocytes (Fig. 4A; $n=15$ slices, 888 cells). Using the same conditions, GABA (20 μ M) induced a calcium rise in $23.5\pm8.0\%$ SNr astrocytes (Fig. 4C; $n=18$ slices, 1053 cells).

These agonist-induced calcium responses may reflect a direct effect on astrocytic receptors and/or an indirect effect via neuronal receptors leading to secondary transmitter release. We therefore blocked neuronal transmission with TTX (500 nM) and observed that it did not inhibit the astrocytic calcium response induced by glutamate or GABA suggesting a direct action of these mediators on astrocytic receptors (Fig. 4B and D; $n=12$ and 9 slices respectively; $p=0.32$ and 0.21 respectively).

To identify the molecular actors responsible for the induced calcium responses, we applied specific inhibitors of the agonists tested. CNQX (10 μ M), an AMPA receptor inhibitor, significantly decreased the glutamate-induced response ($55.3\pm4.0\%$ inhibition; $p<0.001$; $n=8$ slices, 346 cells). LAP-3 (100 μ M), a group I mGluR inhibitor also significantly decreased the glutamate-induced response ($31.5\pm4.6\%$ inhibition; $p=0.005$; $n=11$ slices, 552 cells; Fig. 4B), whereas AP-5 (50 μ M), a selective NMDAR inhibitor, had no significant effect ($9.5\pm5.1\%$ inhibition; $p=0.453$; $n=4$ slices, 130 cells). The combination of these glutamate receptors inhibitors (CNQX 10 μ M, LAP-3 100 μ M, AP-5

50 μM) produced an additive significant decrease on the glutamate-induced Ca^{2+} response ($84.0 \pm 7.7\%$ inhibition; $p = 0.003$; $n = 4$ slices, 332 cells; Fig. 4A). We confirmed the lack of response dependent on NMDAR in SNr astrocytes by applying NMDA 100 μM with TTX 500 nM ($2.6 \pm 1.2\%$ active astrocytes, $n = 6$ slices, 122 cells). Bicuculline (BMI, 20 μM ; an inhibitor of GABA_A receptors) significantly decreased the GABA-induced Ca^{2+} response ($77.2 \pm 15.8\%$ inhibition; $p = 0.02$; $n = 7$ slices, 490 cells; Fig. 4D) while 2-hydroxysaclofen 100 μM (an inhibitor of GABA_B receptors) had no significant effect ($12.1 \pm 2.4\%$ inhibition; $p = 0.948$; $n = 8$ slices, 328 cells; Fig. 4D), suggesting that GABA_B receptors are poorly expressed by SNr astrocytes.

These pharmacological data provide strong evidence for the expression of AMPA, mGlu and GABA_A receptors by SNr astrocytes, all of which being potentially involved in calcium signaling in these cells.

Contribution of glutamate and GABA to the spontaneous calcium activity of SNr astrocytes

As shown above, the subthalamo-nigral and pallido-nigral pathways were partially preserved in sagittal slices. As neurons are known to be spontaneously active in these nuclei, even in slice preparations [2,45], SNr activity is constantly modulated by the balance between GABA and glutamate, originating from the GPe and STN, respectively. This balance could also potentially influence astrocytic activity within the SNr, as these cells were found to express the required receptors. As only half of the spontaneous calcium activity of astrocytes is autonomous within SNr, we investigated the relative contribution of glutamatergic and GABAergic influences to the non-autonomous part of spontaneous calcium activity. The application of a combination of glutamate receptors inhibitors (10 μM CNQX, 100 μM LAP-3, 50 μM AP-5) inhibited $63.6 \pm 11.1\%$ active astrocytes within the SNr (Fig. 4E and F; $p < 0.001$; $n = 10$ slices from 7 rats, 629 cells). Bicuculline 20 μM (BMI) inhibited $47.7 \pm 18.8\%$ spontaneous active SNr astrocytes ($p = 0.003$; $n = 7$ slices from 5 rats, 447 cells).

Thus, like SNr neurons, SNr astrocytes display spontaneous activity that is partially dependent on the release of GABA and glutamate within the SNr.

Modulation of the activity of astrocytes by electrical stimulation of the STN

STN-HFS is a remarkable tool for alleviating the motor symptoms of advanced Parkinson's disease but the cellular substrates responsible for these promising results remain a matter of debate. STN-HFS may produce its effects by activating the axons of STN neurons, STN afferents or fibers passing close to the stimulation site, leading to the release of glutamate and/or GABA within the SNr [15,16,17,35]. In normal rats, STN-HFS generates concomitant excitatory-inhibitory synaptic currents in SNr neurons by recruiting efferent and passing fibers [34]. Depending on the amplitude and frequency used, electrical stimulation has been shown to differentially impact the glutamate and/or GABA release within SNr [16,46]. These data raised questions about the effects of STN electrical stimulation on the activity of SNr astrocytes in sagittal slices. We applied bipolar electrical stimulation to the STN during a 5 minute recording period, varying amplitude or frequency parameters. First, using a stimulation frequency of 100 Hz, we varied the amplitude (Fig. 5A). We prior checked that single STN electrical stimulations were effective to induce postsynaptic currents in SNr neurons in our conditions. At 100 μA , STN-HFS triggered a significant decrease in the proportion of active astrocytes in the SNr ($70.8 \pm 10.6\%$;

$p = 0.011$; $n = 9$ slices from 7 rats, 514 cells). At 200 μA , a significant increase in the proportion of active astrocytes was observed ($153.4 \pm 42.3\%$; $p = 0.008$; $n = 15$ slices from 12 rats, 1006 cells). This significant increase also occurred for an amplitude of 400 μA ($148.2 \pm 38.2\%$; $p = 0.004$; $n = 14$ slices from 10 rats, 867 cells) but was not observed at an amplitude of 500 μA ($108.1 \pm 18.7\%$; $p = 0.375$; $n = 8$ slices from 6 rats, 619 cells). Thus, like SNr neurons, astrocytes were differentially affected by STN-HFS induced imbalance in glutamate/GABA release.

In a second series of experiments, we set the amplitude at 400 μA and varied the frequency (Fig. 5B). At a low frequency (10 Hz), STN electrical stimulation had no effect on the proportion of active astrocytes ($89.3 \pm 22.5\%$; $p = 0.896$; $n = 15$ slices from 11 rats, 684 cells). Similarly, at 230 Hz, STN electrical stimulation did not induce any significant effect on the number of active astrocytes ($114.7 \pm 44.8\%$; $p = 0.817$; $n = 5$ slices from 4 rats, 183 cells).

Whatever the stimulation parameters used no significant difference in calcium signal duration, frequency or amplitude was observed when electrical stimulation was delivered to the STN. When STN-HFS was applied, the delay of occurrence of the first calcium event in active astrocytes was 110.7 ± 8.0 s ($n = 9$ slices, 121 active cells). This delay was not significantly different from the one measured without STN-HFS (106.1 ± 9.4 s; $p = 0.537$; $n = 9$ slices, 94 active cells). No synchronous activity between active astrocytes was highlighted during STN electrical stimulation. Thus, only the percentage of active astrocytes was affected by STN-HFS and these newly active astrocytes were recruited all along the STN-HFS period (Fig. 5D and E).

At the end of the STN-HFS period, applied at an efficient amplitude (200–400 μA), the proportion of active astrocytes returned to its basal level and no residual effect was observed during a 5 minutes recording post STN-HFS ($91.2 \pm 12.0\%$ residual activity; $p = 0.383$; $n = 7$ slices from 6 rats, 369 cells; Fig. 5D and E).

When the electrode was placed outside the STN, just to the side of the internal capsule or in a medial position, no significant response was observed within the SNr. Moreover, when TTX (500 nM) was applied locally in the SNr during STN electrical stimulation (100 Hz, 200 μA), we observed a significant inhibition of the SNr astrocytic calcium activity ($24.9 \pm 7.2\%$ remaining active astrocytes; $p = 0.001$; $n = 9$ slices, 463 cells; Fig. 5C). This residual effect corresponds to the autonomous part of the astrocytic activity. This implies that the observed effect was specifically due to the stimulation of subthalamo-pallido-nigral projections rather than to electrical field diffusion.

Thus, when the parameters used corresponded to those routinely used in parkinsonian patients (with the amplitude adapted to the size of the rat STN [46,47] i.e. 200 to 400 μA), electrical stimulation of the STN induced significant astrocyte activation in the SNr as testified by the increase in the proportion of astrocytes displaying intracellular calcium variations. This activation did not persist when STN-HFS is switched off.

Involvement of astrocytic AMPA, mGlu and GABA_A receptors in the increase of SNr astrocytic calcium activity induced by STN-HFS

In order to assess the implication of GABA and glutamate release in the modulation of the astrocytic calcium response triggered by STN electrical stimulation, we locally inhibited these transmitter receptors and compared the effect of STN electrical stimulation (100 Hz, 200 μA) on calcium response in the SNr without inhibitor application. We investigated whether the calcium response was dependent on glutamate by locally applying

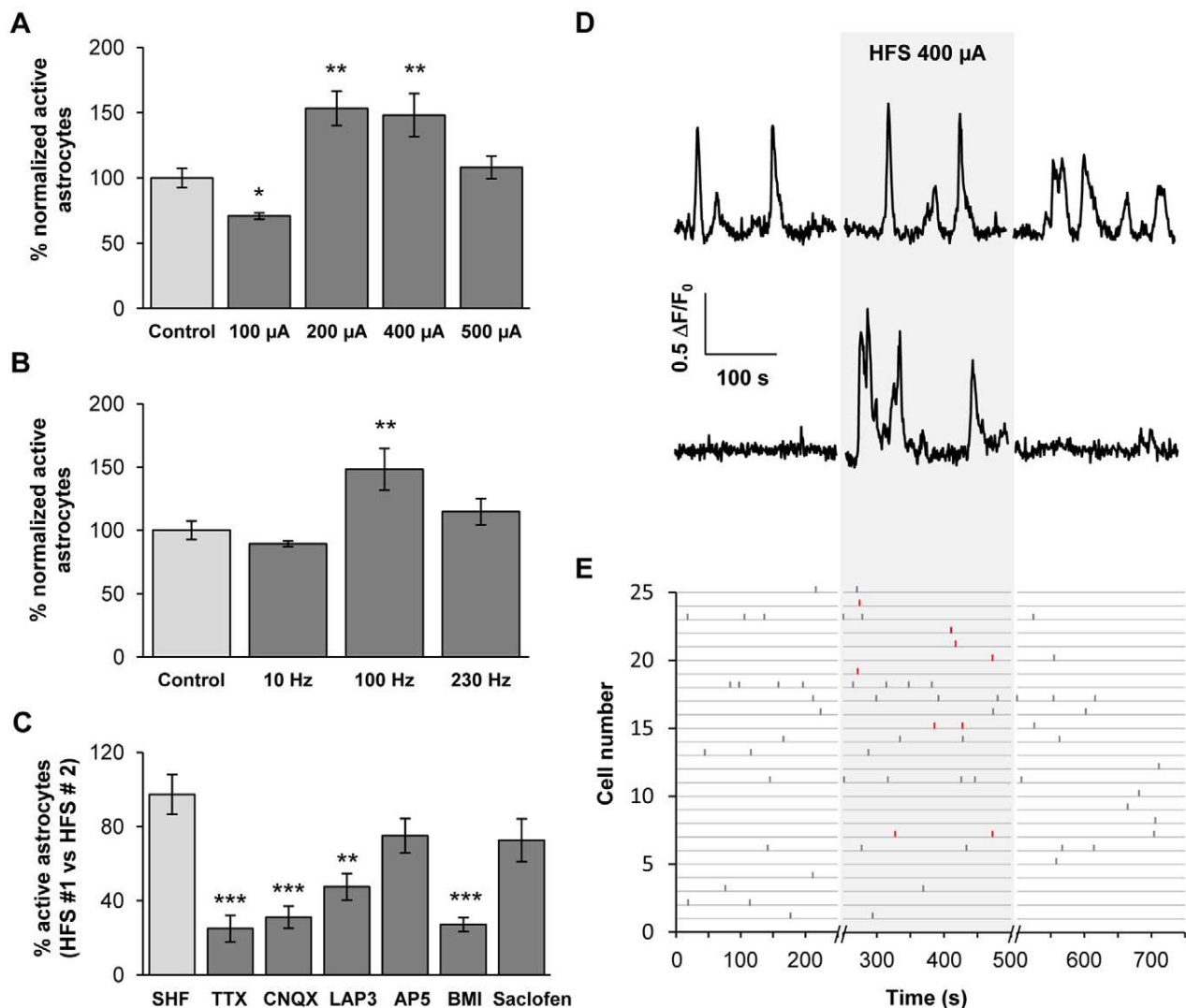


Figure 5. SNr astrocytic calcium activity is modulated by STN electrical stimulation. (A) Proportion of loaded astrocytes in the SNr displaying calcium activity during five minutes of STN-HFS (100 Hz) at an intensity of 100 μA ($n=14$; $p=0.011$), 200 μA ($n=15$; $p=0.008$), 400 μA ($n=14$; $p=0.004$) or 500 μA ($n=8$; $p=0.375$). (B) Proportion of loaded astrocytes in the SNr displaying calcium activity during 5 minutes of STN electrical stimulation at 400 μA with a frequency of 10 Hz ($n=15$; $p=0.896$), 100 Hz ($n=14$; $p=0.004$) or 230 Hz ($n=5$; $p=0.817$). The effect of STN electrical stimulation was normalized with respect to control residual activity. (C) Percentage of SNr astrocytes responding to STN electrical stimulation (100 Hz, 200 μA) in the presence of ACSF (SHF; $n=9$), 500 nM TTX ($n=9$; $p=0.001$), 10 μM CNQX ($n=9$; $p<0.001$), 100 μM LAP-3 ($n=8$; $p=0.01$), 50 μM AP-5 ($n=13$; $p=0.121$), 20 μM bicuculline (BMI; $n=30$; $p<0.001$) or 100 μM saclofen ($n=7$; $p=0.266$). Inhibitory effects were compared to a first recording under STN-HFS in the same area. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ and ***, $p<0.001$. (D) Typical fluorescence variations recorded in two SNr astrocytes before, during (gray background) and after STN-HFS (100 Hz, 400 μA) (E) Raster plot of fluorescence peaks detected in active ROIs before, during (gray background) and after STN-HFS (100 Hz, 400 μA), exemplifying that only the number of active cells is enhanced while the frequency in active cells is not affected. Newly active cells during STN-HFS are depicted in red.

doi:10.1371/journal.pone.0041793.g005

glutamate receptor inhibitors in the SNr. CNQX (10 μM) decreased the astrocytic calcium response induced by STN-HFS ($31.1\pm6.0\%$ remaining active astrocytes; $p<0.001$; $n=9$ slices, 505 cells). LAP-3 (100 μM) also significantly decreased the SNr calcium response ($47.5\pm7.2\%$ remaining active astrocytes; $p=0.01$; $n=8$ slices, 352 cells), whereas AP-5 (50 μM) had no significant effect ($75.03\pm9.2\%$ remaining active astrocytes; $p=0.121$; $n=13$ slices, 487 cells). Application of a cocktail of glutamate receptor inhibitors (CNQX 10 μM, LAP-3 100 μM, AP-5 50 μM) to the SNr induced a significant decrease in the number of responding cells ($34.2\pm4.9\%$ remaining active astrocytes; $p<0.001$; $n=11$ slices, 844 cells), in the same range as

CNQX alone. These data suggest that an increase in glutamate release within the SNr during STN electrical stimulation is partly responsible for the astrocytic calcium response.

Local application of bicuculline (BMI, 20 μM) to the SNr significantly decreased the SNr astrocytic calcium response to STN electrical stimulation ($27.1\pm3.8\%$ remaining active astrocytes; $p<0.001$; $n=24$ slices, 1495 cells; Fig. 5C), indicating that GABA is also involved in the STN-HFS effect on astrocytes within the SNr through GABA_AR activation. In the same conditions, 2-hydroxysaclofen (100 μM) failed to significantly inhibit the STN electrical stimulation effect ($72.6\pm11.6\%$ remaining active astrocytes; $p=0.266$; $n=7$ slices, 380 cells), confirming that GABA_BRs

are not involved in the SNr astrocytic response. Concomitant applications of glutamate receptor inhibitors and BMI had no additive inhibitory effect compared to those obtained with each group of inhibitor (not shown). These results suggest that glutamate and GABA are both involved in the astrocytic calcium response induced by STN-HFS. Astrocytic AMPAR, mGluR and GABA_AR are involved in this activity increase.

Discussion

In this study, we used calcium imaging to monitor SNr astrocytic calcium activity and the effects of modulating some of the basal ganglia networks that are known to influence the regulation of the SNr output activity. We took advantage of the sagittal brain slice preparation that preserved the pace-maker activity of the STN-GPe-SNr loops to modify its activity and investigate the impact of STN electrical stimulation on the activity of SNr astrocytes. SNr astrocytes displayed spontaneous calcium activity in basal physiological conditions. About half (48%) of this activity was found to be autonomous (*i.e.* independent of neuronal activity) while the other half is dependent on the spontaneous release of glutamate and GABA, probably under the control of the STN-SNr and GPe-SNr pathways. Changes of the activity of STN-GPe-SNr loops (induced by STN electrical stimulation) affected this astrocytic calcium activity in a consistent way to the amount of current delivered to the STN. Astrocytic AMPAR, mGluR and GABA_AR are involved in the specific response of SNr astrocytes when STN is electrically stimulated. Thus, in physiologically preserved active loops, astrocyte activity is affected by glutamate/GABA release as is SNr neuronal output activity.

Technical considerations and validity of the model

The excitability of astrocytes is mediated by increases in the intracellular Ca²⁺ concentration [22]. Calcium imaging provides readout of this cell excitation, monitoring the activities of dozens of cells simultaneously. Its use on brain slices makes it possible to study cells in a physiological context, preserving some networks and environmental background. Astrocytes represent the major cell population in the SNr but their role remains unclear. In our loading conditions, few neurons were loaded in the SNr allowing specific study of the activity of astrocytes. However, we showed that most of the SNr neuronal cells in the brain slice were functional even if they were not loaded.

Sulforhodamine stainings revealed that more than 98% of SNr recorded cells were astrocytes, meaning that involvement of other glial cells may be considered insignificant.

The sagittal slice allows study of the communication between astrocytes and neurons in an integrated loop endowed with spontaneous pace-maker activity. A major point is that we can modulate the SNr activity by electrically stimulating a distant nucleus (*e.g.* STN). These nuclei (STN, GPe and SNr) are of major importance within the basal ganglia network in physiological or pathological conditions (*e.g.* Parkinson disease) and are at the heart of the most famous example of a functional restoration of the network activity by STN-HFS. Thus, this model will be very useful for deciphering the nature of neuron-astrocyte communication within the SNr, in physiopathological conditions and under STN-HFS. More often, non physiological or direct stimulations were used in astrocyte studies in other brain areas [48,49,50]. Modulating STN-GPe-SNr loops with STN-HFS allows to interact in a physiological way with SNr astrocytes.

Evoked and autonomous spontaneous astrocytic calcium activity

We showed that only 48% of astrocytic calcium activity in the SNr is autonomous, *i.e.* independent of neuronal activity. In other brain structures such as the hippocampus [48,51] and somatosensory cortex [52], astrocytic calcium activity is known to be totally independent of neuronal activity and is therefore considered autonomous. Indeed, in these structures, there is no tonic spontaneous release of neurotransmitters at rest. The spontaneous pace-maker activity of STN-GPe-SNr loops and the continual release of glutamate and GABA within the SNr, probably account for the distinctive nature of the spontaneous calcium activity in SNr astrocytes, fitting with their environment and sensing the neurotransmitter released. Thus, the existence of two different modes of spontaneous Ca²⁺ signaling within astrocytes, *i.e.* autonomous and activity-evoked, should have specific physiological roles fitting with astrocyte function in SNr [53].

The evoked part of spontaneous calcium activity is dependent, at least, on glutamate and GABA release within the SNr. GABAergic pallidal activity, glutamatergic STN activity and/or GABAergic intranigral activity may potentially contribute to this evoked basal glial calcium activity. *In vivo*, neurochemical data have shown that, within intact SNr, the extracellular glutamate concentration is 16 times higher than GABA [54]. Indeed, the proportion of glutamate-responding astrocytes is significantly higher than the proportion of GABA-responding astrocytes (59.3±8.8% versus 23.5±8.0%; *p*<0,001). This heterogeneity in astrocytic sensitivity might depend on their proximity to intranigral axon collaterals, GPe-SNr or STN-SNr projections, as described in hippocampus [55]. The major input to GABAergic SNr neurons arises from STN whereas GABAergic projections from GPe are fewer [56,57]. This particular astrocyte sensitivity will be further explored in pathological situations where the GABA/glutamate balance is disrupted.

Moreover, transmitters such as serotonin, endocannabinoid and dopamine could also be involved in part of this evoked spontaneous activity. We will further explore the contribution of these pathways to neuron-astrocyte communication within SNr.

Imbalance of the STN-GPe-SNr loops through STN electrical stimulation

Given the importance of the GABA/glutamate balance in the SNr output activity [13,14,15], studies on the effect of this balance on glial cell-dependent neuromodulation are of great interest. The efficacy of STN-HFS for alleviating Parkinson's disease symptoms has highlighted the value of treatment strategies bypassing the dopamine system to restore balance in the basal ganglia motor circuitry. *In vivo*, neurochemical data have shown that electrical stimulation of STN at clinical parameters induces an increase of both glutamate and GABA contents in the SNr of intact rats [15]. These data have been confirmed by electrophysiological studies performed in rats [13,34] and monkeys [58] demonstrating a concomitant excitatory and inhibitory effect of STN-HFS on SNr neuronal activity mediated by glutamate and GABA action. These complex effects are known to depend on current intensity [34,46] and frequency [11,16]. *In vivo*, a weak current intensity (<60 μA) did not affect extracellular glutamate and GABA levels in SNr of intact rats, [46]. In our model, we showed that a weak intensity (100 μA) significantly decreased the proportion of active astrocytes in the SNr. This could be due to an imposed decrease of the activity pattern of STN neurons as reported in rat brain slices at such a low intensity [11]. On the contrary, when intensities are close to clinical parameters, STN-HFS is known to impose a new

activity pattern on STN neurons [11] together with activation of pallidonigral fibers and the intranigral axon collaterals of SNr cells [13] leading to concomitant glutamate and GABA release in SNr during the stimulation period [46]. In agreement with these data, we found that the proportion of active astrocytes significantly increased at 200 and 400 μ A. This increase was due to the activation of astrocytic AMPA, mGlu and GABA_A receptors. Thus, there is a window of STN-HFS intensity that enhances calcium activity in astrocytes through an increase of GABA and glutamate release. Higher intensity (500 μ A) had no effect on the astrocyte calcium activity even though an effect on SNr neuronal activity has been reported in rat brain slices [34].

In the same way, it has been shown that low frequency (10 Hz) STN electrical stimulation did not modify ongoing STN activity [11] and did not affect glutamate and GABA levels within SNr in intact rats [33]. Concordantly, we showed that low frequency (10 Hz - 400 μ A) STN electrical stimulation had no effect on the proportion of active astrocytes. At 350 Hz, it has been reported that only GABA increased, due to a differential recruitment of STN and GPe fibers [16]. In our model, at 230 Hz (we could not go further without damaging the slice) there is no effect on the proportion of active astrocytes. It is possible that the frequency threshold to recruit only GPe fibers was not reached. It could also be due to a differential distribution of nearby GABAergic projections from GPe *vs* intranigral axon collaterals or to regionalization of GABA_AR within astrocytes leading to a lesser sensitivity of SNr astrocytes to GABA release from GPe.

Altogether these results reveal that modification of GABA/glutamate release strongly affect not only neurons but also the activity of the astrocytic compartment. Only the proportion of active astrocytes is enhanced suggesting a supplemental recruitment of astrocytes, potentially close to activated synapses. This recruitment is concomitant with STN-HFS and did not persist after the STN-HFS has been switched off. Thus, the additional calcium signaling may activate specific astrocytic pathways suggesting functional consequences on overall activity of SNr.

Functional relevance

Calcium is considered as a key second messenger in astrocyte-neuron communication. Astrocytes use a different language, a different way of getting input and output, on a totally different timescale from neurons but superimposed with it. The functional consequence on the information leaving the SNr might be complex to decipher. Modulating the astrocytic calcium activity in a physiological loop would allow the study of its impact on SNr neuronal signaling. Astrocytes are involved in various and ubiquitous functions within the brain, some of them being calcium-dependent [39]. Indeed, astrocytic calcium activity has been involved in short-term and long-term plasticity [59] but a better understanding of calcium dynamics, signaling and gliotransmitter release is necessary to underline calcium as the key second messenger in astrocyte-neuron communication and neuronal plasticity in Parkinson disease. Few studies have focused on the involvement of astrocytes in the basal ganglia network activity. In normal rats, it has been shown that astrocytes, via the uptake of neurotransmitters, increase the strength of filtering operated through striatal medium spiny neurons [60]. In parkinsonian monkeys, a significant expansion of the astrocyte coverage has been described in glutamatergic striatal synapses providing evidence for compensatory changes that affect both neuronal and astrocytic elements in striatum, suggesting an active role in transmitter homeostasis [61]. Optogenetic studies, performed in hemiparkinsonian rats, reported that light stimulation of STN astrocytes inhibited neuronal firing in STN although no motor

consequences were observed [62]. Thus, it becomes crucial to fully take into account and investigate the contribution of astrocytes in the physiology and pathophysiology of the basal ganglia output structures. Combining calcium imaging, patch-clamp experiments and physiological modification of the STN-GPe-SNr loop activity will allow us to go further in this field.

Conclusion

The originality of this study lies in its novel approach, complementary to the traditional research route focusing mainly on the influence of neurons within pathophysiological mechanisms. More specifically, it brings new insight concerning the role of astrocytes in deep brain stimulation mechanisms. STN-HFS affecting SNr astrocytic calcium activity suggests a potential functional role for astrocytes in pathophysiological processes concerning this basal ganglia output structure. The glutamate/GABA balance is already known to be of major importance in the regulation of SNr neuronal activity, mainly through the drastic effects of its deregulation. For the first time, we show that modification of glutamate and GABA release also has a strong impact on astrocyte activity. The actual knowledge on neuron-astrocyte communication prods us into hypothesize that astrocytes could be effective partners in the modulation of SNr neuronal activity and in counteracting abnormal neuronal activity within the basal ganglia network. The next step will be to further study the impact of the astrocytic calcium activity on the SNr output neuron activity either in physiological or in dopamine denervation conditions.

Materials and Methods

Slice preparation

Sagittal slices containing the rostral midbrain (300 μ m thick) were prepared from young male Sprague-Dawley rats (postnatal days 17–21; Janvier, Le Genest St Isle, France). In compliance with the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), research involving animals has been authorized by the Direction Départementale de la Protection des Populations, Préfecture de l'Isère, France (M. Albrieux, PhD, permit number 38 10 22; S. Boisseau, PhD, permit number 38 09 35). Moreover, all animal procedures were carried out in accordance with the French guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the "Grenoble Institute of Neurosciences ethical committee" (agreement number 004). Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering during the experimental procedure. Rats were killed by decapitation and their brains were removed rapidly and cut into slices with a vibratome VT1000S (Leica, Wetzlar, Germany) in cold low Ca^{2+} -high Mg^{2+} artificial cerebral spinal fluid (ACSF) containing: 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 7 mM MgCl_2 , 0.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 11 mM D-glucose, bubbled with 95% O_2 /5% CO_2 . Sagittal slices containing the GPe, the STN and the SNr were placed in ACSF (126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM NaH_2PO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 11 mM D-glucose) saturated with 95% O_2 /5% CO_2 and supplemented with 1 mM sodium pyruvate at room temperature, for a recovery period [63].

Projection tracing

We checked the integrity of the STN-SNr and GPe-SNr pathways on the sagittal slices by injecting DiI into these nuclei. We fixed acute slices in 4% paraformaldehyde solution (Electron Microscopy Science, Hatfield, Pennsylvania, USA) overnight at

room temperature. We then placed crystals of DiI (1,1'-diiododecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) on the STN or the SNr for anterograde or retrograde labeling. Slices were washed twice, for 10 minutes each in 0.1 M PB (0.1 M potassium phosphate and 0.019 M sodium phosphate; pH 7.2), then kept in the dark at room temperature for 4 weeks [64].

Cell viability

In some experiments, cell viability was estimated at various stages of the slicing, loading and recording protocol, by propidium iodide staining (0.75 μ M; Sigma-Aldrich) for 1 minute. The slices tested had previously been incubated with Hoechst 33342 (5 μ M; Molecular Probes) for 30 minutes in the dark. Images were acquired with an upright compound microscope (Eclipse E600 FN, Nikon, Paris, France) equipped with a water immersion 20 \times objective (NA 0.5) and a confocal head (confocal C1 head, Nikon, Paris, France).

Immunostaining

Postnatal day 20 rats ($n=6$) were anesthetized with chloral hydrate (0.5 ml/100 g) and killed by transcardiac perfusion with 10 ml phosphate buffer saline (PBS, 0.1 M) followed by 35 ml 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science, Hatfield, Pennsylvania, USA). Brains were quickly removed from the skull after the perfusion and postfixed in 4% paraformaldehyde at 4°C overnight. Brains were then rinsed in 20% sucrose (Sigma) for 48 h, frozen in dry ice (-40°C) and stored at -80°C until use. Sagittal tissue sections at the SNr level (20 μ m) were cut on a cryostat (HM 500 M, Microm, Francheville, France) and collected in antifreeze solution. Floating sections were washed in TBS buffer (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl) and blocked by incubation with 3% normal goat serum (NGS, Interchim, Montluçon, France) in TBS-TX (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl, 0.2% Triton X-100) for 30 minutes (dilution/blocking buffer). Tissue sections were then incubated overnight at 4°C with following antibodies: neuron-specific anti-neuronal nuclei antibody [NeuN, Chemicon (Chemicon Europe, Hants, UK), 1:500 in TBS buffer with 1% normal goat serum (dilution buffer)], anti-S100B antibody (Sigma), 1:100 in dilution buffer, anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody [Dako (Dako, Glostrup Denmark)], 1:1000 in dilution buffer, microglial cell-specific anti-CD11b antibody [Ox-42, AbCys (AbCys, Paris, France) 1:100 in dilution buffer], oligodendrocyte lineage-specific anti-Olig 2 antibody [Millipore (Millipore, Billerica, MA, USA), 1:100 in dilution buffer], anti-NG2 antibody (Millipore, 1:100 in dilution buffer). Tissue sections were washed in TBS-TX and incubated for 2 h at room temperature with the appropriate Alexa Fluor 488-conjugated (Molecular Probes) or cyanin 3-conjugated (Jackson ImmunoResearch Laboratories) secondary antibody, in dilution buffer (1:1000). Sections were washed in TBS-TX, incubated with TO-PRO-3 iodide (Invitrogen, 1:1000) for 20 minutes at room temperature for nuclear staining, washed in TBS and mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA). Images were acquired with a TCS-SP2 confocal setup (Leica, Deerfield, IL, USA). For illustrations, images were treated (brightness and contrast adjustments) and merged with Adobe Photoshop CS.

Following calcium imaging, some acute horizontal brain slices (300 μ m thickness) loaded with Fluo-4 were fixed by incubation in 4% paraformaldehyde and 10 mg/ml EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, Sigma) in PBS (31.6 mM NaH_2PO_4 , 68.4 mM Na_2PO_4 , 150 mM NaCl) for 1 h at room temperature, in the dark. EDC fixes calcium chelators, such as Fluo-4 [65]. Immunostaining was then performed as described above.

Sulforhodamine staining

Sulforhodamine 101 sodium salt (Sigma-Aldrich) was injected intravenously at a volume of 100 μ l using a concentration of 10 mg/ml in saline solution. Animals were briefly anesthetized using isoflurane in a 70% air, 30% O_2 gas mixture for the intravenous injection (100 μ l/50 g body weight). After 2 h, the rats were decapitated and their brains were rapidly removed. Acute sagittal brain slices were sectioned as described above.

When required, slices were loaded with Hoechst 33342 (5 μ M; Molecular Probes) for 30 minutes to stain cell nuclei. Stained slices were then placed in a constantly perfused chamber (ACSF bubbled with 95% O_2 /5% CO_2) on the stage of a two-photon laser scanning microscope (TPLSM 7 MP, Zeiss, Germany) equipped with a 20 \times water-immersion objective (NA 1.0; Zeiss) and images were acquired with ZEN 2009 software. Laser excitation at 800–900 nm was carried out with a Ti:Sapphire laser system (Chameleon vision II; Coherent, UK). The excitation wavelengths used for the sulforhodamine dye and Hoechst were respectively 880 nm and 750 nm.

In some experiments, slices were loaded with Fluo-4 AM (5 μ M; Molecular Probes) for 30 minutes and placed in a constantly perfused chamber (ACSF bubbled with 95% O_2 /5% CO_2) on the stage of an upright compound microscope (Eclipse E600 FN, Nikon, Paris, France) equipped with a water immersion 20 \times objective (NA 0.5) and a confocal head (confocal C1 head, Nikon, Paris, France). SR101 was excited at 543 nm and emission was filtered with a 605 ± 75 nm filter. Fluo-4 AM was excited with an argon laser at 488 nm and emission was filtered with a 515 ± 15 nm filter.

Stereological quantification

Acquisitions were performed with a translating platform with motorized crossed roller stages (8 fields of $425\mu\text{m}\times 425\mu\text{m}$ for each SNr area). Image processing was performed with ImageJ software [66]. Multistack (40 slices at 2 μ m spacing) mosaics were reconstructed with the “3D stitching” plugin of ImageJ [67]. Quantitative analysis was based on a two step procedure. First, raw images were segmented by adaptive thresholding (Bernsen) to facilitate automated cell detection. The result was then analyzed with the “3D object counter” plugin [68] in ImageJ. The results are presented as mean \pm SEM.

Calcium imaging on brain slices

Brain slices were loaded with the calcium indicator dye Fluo-4 by immersion for 30 minutes at 35°C in a bath containing 5 μ M Fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), 0.005% Pluronic acid F-127 (Molecular Probes), 0.00025% Cremophor EL (Sigma-Aldrich) and 0.05% DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich) in ACSF. The loading chamber was continuously oxygenated with 95% O_2 /5% CO_2 . Slices were then placed in ACSF saturated with 95% O_2 /5% CO_2 and supplemented with 1 mM sodium pyruvate, at room temperature for at least 45 minutes before imaging. Next, slices were placed in a constantly perfused chamber (ACSF bubbled with 95% O_2 /5% CO_2) on the stage of an upright compound microscope (Eclipse E600 FN, Nikon, Paris, France) equipped with a water immersion 20 \times objective (NA 0.5) and a confocal head (confocal C1 head, Nikon, Paris, France). Experiments were initially performed at both 35°C or at room temperature. No difference in the percentage of activated cells was observed so, for practical reasons, most of the experiments were then performed at room temperature. Excitation was achieved with light at 488 nm from an argon laser and emission was filtered with a 515 ± 15 nm filter. Images were acquired with EZ-C1 software (Nikon, Paris, France), in a

12-bit encoded format. Images were taken at 800 ms intervals in a single confocal plane over a period of 5 minutes.

Pharmacological agonists, such as glutamate, NMDA and GABA (Sigma-Aldrich), or inhibitors, such as tetrodotoxin (TTX; Latoxan, Valence, France), thapsigargin (Molecular Probes), CNQX, L(+)-2-amino-3-phosphonopropionic acid (L-AP3), D(−)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5), bicuculline (BMI) and 2-hydroxysaclofen (Sigma-Aldrich), were perfused in the bath. The inhibitory effects of antagonists on spontaneous calcium activity were assessed by comparison to a first recording of calcium activity performed in the same area. In these conditions, the percentage of residual active cells in a control experiment was not significantly different in the second recording ($79.5 \pm 7.4\%$, $p = 0.183$, $n = 18$ slices from 11 rats, 1077 cells) and there was also no significant difference in the calcium signal parameters (amplitude, duration, frequency). The inhibitory effect of all tested antagonists was assessed by comparison with this control experiment and normalization. The evoked effect of glutamate and GABA on astrocyte calcium activity and the inhibitory effect of antagonist on exogenous glutamate and GABA applications were assessed by analyzing the cells on addition of the agonist to the bath and in the 10 images following agonist addition. The inhibitory effects of antagonists on STN-HFS induced activity were compared versus a control group of HFS where two successive stimulations were applied to the slice. In that case, the HFS #2 represented $97.3 \pm 11.6\%$ of the HFS #1 response ($p = 0.570$; $n = 9$ slices from 8 rats, 754 cells). In these experiments, inhibitors were applied locally in order to affect the SNr but not the STN or GPe.

Quantification and statistical analysis

CalSignal software was used to detect cells and measure their intracellular Ca^{2+} activity [69]. This software can automatically detect and track hundreds of cells per slice and carries out statistical analysis for numerous parameters, analyzing the fluorescence signal F within each region of interest. F_0 was calculated for each region of interest (ROI) on the recording period or, when an agonist was applied, it was calculated on the period before the drug application. Based on the $\Delta F/F_0$ ratios, significant fluorescence variations were detected and their amplitude and duration were calculated. These data were exported to SigmaStat software (Systat) for statistical analysis. All results are presented as mean \pm SEM. When inhibitors were applied, each slice was its own control since we compared the effect of the pharmacological agent tested on spontaneous calcium activity with an initial recording in the same area during the same duration before treatment. Statistical analyses were carried out with Mann-Whitney-Wilcoxon tests with significance levels of *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$.

We performed cross-correlation analysis to estimate synchrony between cells. The cross-correlations between the calcium signals of couple of cells were calculated at time lags varying between -3 and $+3$ s using the “crosscoef” function in Matlab. When the cross-correlation coefficient exceeded 0.7, the cell couples were considered as synchronous [48].

References

- Hikosaka O (2007) GABAergic output of the basal ganglia. *Prog Brain Res* 160: 209–226.
- Richards CD, Shirozumi T, Kitai ST (1997) Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* 80: 545–557.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13: 281–285.

We used young rats to optimize Fluo-4 loading. We therefore checked the possible age-dependence of the recorded response. We found no significant differences (Kruskal-Wallis analysis) in either the percentage of cells displaying spontaneous calcium activity (P17: $33.1 \pm 4.7\%$; P18: $26.7 \pm 3.1\%$; P19: $35.7 \pm 5.7\%$; P20: $21.0 \pm 4.7\%$; $p = 0.232$), or the percentage of cells responding to electrical ($p = 0.595$) or chemical stimuli (Glutamate: $p = 0.165$; GABA: $p = 0.267$) from P17 to P21, so results were pooled for analysis.

Electrical stimulation procedures

A concentric bipolar stimulation electrode (platinum/iridium; Frederick Haer & Co., USA) was positioned in the middle of the STN within the brain slice. The electrical stimulation consisted of multiple rectangular pulses (0.1 ms duration; 10, 100 or 230 Hz) of constant current (100 to 500 μA) applied during the 5 minute recording period. These parameters correspond to those routinely used in parkinsonian patients, but the amplitude was adapted to the size of the rat STN [46,47]. At intensities above 600 μA at 100 Hz or 400 μA at 250 Hz, stimulation resulted in tissue damage (burn and lesion). As for the application of inhibitors described above, the impact of STN electrical stimulation on astrocytic calcium activity parameters was determined by comparison with an initial recording of the same area. The positive or negative effect of STN-HFS was assessed by comparison with the previous control experiment and normalization.

Supporting Information

Figure S1 S100B and GFAP immunostainings in the SNr. (A) Two-photon multistack (9 slices at 2 μm spacing) mosaic reconstruction of S100B immunostaining in the SNr of a fixed brain slice. Antero-posterior (AP) and medio-lateral (ML) orientations are shown in the upper right part of the figure. (B) Confocal images of S100B (green) and GFAP (red) immunostained cells in the SNr of a sagittal section of rat brain. Merged image showing the proportion of S100B and GFAP positive cells (right panel). Nuclei are identified by TO-PRO staining (blue). Arrow indicates a GFAP positive cell that is S100B negative and arrowheads show several S100B-positive cells that are GFAP negative. (TIF)

Acknowledgments

We wish to thank Jean-Claude Platel for CalSignal software updates and for stimulating scientific discussions, Mathieu Maurin for discussions relating to stereological quantification and Fiona Hemming for correcting the english. Two-photon imaging was performed at the Grenoble Intravital Microscopy facility (IBiSA ISdV).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EB SB CB MA. Performed the experiments: EB SB CB FA MA. Analyzed the data: EB SB CB MA. Contributed reagents/materials/analysis tools: FA MS MA. Wrote the paper: EB SB MS MA.

8. Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72: 507–520.
9. Benazzouz A, Piallat B, Pollak P, Benabid AL (1995) Responses of substantia nigra pars reticulata and globus pallidus complex to high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats: electrophysiological data. *Neurosci Lett* 189: 77–80.
10. Beurrier C, Bioulac B, Audin J, Hammond C (2001) High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. *J Neurophysiol* 85: 1351–1356.
11. Garcia L, Audin J, D'Alessandro G, Bioulac B, Hammond C (2003) Dual effect of high-frequency stimulation on subthalamic neuron activity. *J Neurosci* 23: 8743–8751.
12. Benazzouz A, Hallett M (2000) Mechanism of action of deep brain stimulation. *Neurology* 55: S13–16.
13. Maurice N, Thierry AM, Glowinski J, Deniau JM (2003) Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 23: 9929–9936.
14. Degos B, Deniau JM, Thierry AM, Glowinski J, Pezard L, et al. (2005) Neuroleptic-induced catalepsy: electrophysiological mechanisms of functional recovery induced by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25: 7687–7696.
15. Windels F, Bruet N, Poupard A, Urbain N, Chouvet G, et al. (2000) Effects of high frequency stimulation of subthalamic nucleus on extracellular glutamate and GABA in substantia nigra and globus pallidus in the normal rat. *Eur J Neurosci* 12: 4141–4146.
16. Windels F, Bruet N, Poupard A, Feuerstein C, Bertrand A, et al. (2003) Influence of the frequency parameter on extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid in substantia nigra and globus pallidus during electrical stimulation of subthalamic nucleus in rats. *J Neurosci Res* 72: 259–267.
17. Dostrovsky JO, Lozano AM (2002) Mechanisms of deep brain stimulation. *Mov Disord* 17 Suppl 3: S63–68.
18. Deniau JM, Mailly P, Maurice N, Charpier S (2007) The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Prog Brain Res* 160: 151–172.
19. Verkhratsky A, Steinhauser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 380–412.
20. Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2: 185–193.
21. Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32: 421–431.
22. Perea G, Araque A (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38: 375–382.
23. Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40: 389–400.
24. Wang X, Lou N, Xu Q, Tian GF, Peng WG, et al. (2006) Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci* 9: 816–823.
25. Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16: 5073–5081.
26. Fiacco TA, Aguilhon C, McCarthy KD (2009) Sorting out astrocyte physiology from pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49: 151–174.
27. Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3948–3952.
28. Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, et al. (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125: 775–784.
29. Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4: 803–812.
30. Parri R, Crunelli V (2003) An astrocyte bridge from synapse to blood flow. *Nat Neurosci* 6: 5–6.
31. Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24: 722–732.
32. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63: 795–813.
33. Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic Press.
34. Bosch C, Degos B, Deniau JM, Venance L (2011) Subthalamic nucleus high frequency stimulation generates a concomitant synaptic excitation-inhibition in substantia nigra pars reticulata. *J Physiol* 589: 19.
35. Deniau JM, Degos B, Bosch C, Maurice N (2010) Deep brain stimulation mechanisms: beyond the concept of local functional inhibition. *Eur J Neurosci* 32: 1080–1091.
36. Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, et al. (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152: 1024–1031.
37. Parent A (1990) Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13: 254–258.
38. Hewett JA (2009) Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J Neurochem* 110: 1717–1736.
39. Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86: 342–367.
40. Verant P, Ricard C, Serduc R, Vial JC, van der Sanden B (2008) In vivo staining of neocortical astrocytes via the cerebral microcirculation using sulforhodamine B. *J Biomed Opt* 13: 064028.
41. Appaix F, Girod S, Boisseau S, Romer J, Vial JC, et al. (2012) Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes. *PLoS One* 7: e35169.
42. Ikegaya Y, Le Bon-Jego M, Yuste R (2005) Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci Res* 52: 132–138.
43. Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78: 99–141.
44. Kettenmann H, Schachner M (1985) Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *J Neurosci* 5: 3295–3301.
45. Bevan MD, Magill PJ, Terman D, Bolam JP, Wilson CJ (2002) Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci* 25: 525–531.
46. Boulet S, Lacombe E, Carcenac C, Feuerstein C, Sgambato-Faure V, et al. (2006) Subthalamic stimulation-induced forelimb dyskinesias are linked to an increase in glutamate levels in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 26: 10768–10776.
47. Shen KZ, Johnson SW (2006) Subthalamic stimulation evokes complex EPSCs in the rat substantia nigra pars reticulata in vitro. *J Physiol* 573: 697–709.
48. Sasaki T, Kuga N, Namiki S, Matsuki N, Ikegaya Y (2011) Locally Synchronized Astrocytes. *Cereb Cortex* 2011: 6.
49. Bernardinelli Y, Salmon C, Jones EV, Farmer WT, Stellwagen D, et al. Astrocytes display complex and localized calcium responses to single-neuron stimulation in the hippocampus. *J Neurosci* 31: 8905–8919.
50. Schummers J, Yu H, Sur M (2008) Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science* 320: 1638–1643.
51. Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E (2002) Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci* 22: 9430–9444.
52. Takata N, Hirase H (2008) Cortical layer 1 and layer 2/3 astrocytes exhibit distinct calcium dynamics in vivo. *PLoS One* 3: e2525.
53. Fellin T (2009) Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J Neurochem* 108: 533–544.
54. Windels F, Carcenac C, Poupard A, Savasta M (2005) Pallidal origin of GABA release within the substantia nigra pars reticulata during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25: 5079–5086.
55. Perea G, Araque A (2005) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25: 2192–2203.
56. von Krosigk M, Smith Y, Bolam JP, Smith AD (1992) Synaptic organization of GABAergic inputs from the striatum and the globus pallidus onto neurons in the substantia nigra and retrorubral field which project to the medullary reticular formation. *Neuroscience* 50: 531–549.
57. Groenewegen HJ, Berendse HW (1990) Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. *J Comp Neurol* 294: 607–622.
58. Kita H, Tachibana Y, Nambu A, Chiken S (2005) Balance of monosynaptic excitatory and disinhibitory responses of the globus pallidus induced after stimulation of the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurosci* 25: 8611–8619.
59. Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317: 1083–1086.
60. Goubard V, Fino E, Venance L (2011) Contribution of astrocytic glutamate and GABA uptake to corticostriatal information processing. *J Physiol* 589: 2301–2319.
61. Villalba RM, Smith Y (2011) Neuroglial plasticity at striatal glutamatergic synapses in Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci* 5: 9.
62. Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 324: 354–359.
63. Beurrier C, Ben-Ari Y, Hammond C (2006) Preservation of the direct and indirect pathways in an in vitro preparation of the mouse basal ganglia. *Neuroscience* 140: 77–86.
64. MacLean JN, Fenstermaker V, Watson BO, Yuste R (2006) A visual thalamocortical slice. *Nat Methods* 3: 129–134.
65. Tymianski M, Bernstein GM, Abdel-Hamid KM, Sattler R, Velumian A, et al. (1997) A novel use for a carbodiimide compound for the fixation of fluorescent and non-fluorescent calcium indicators in situ following physiological experiments. *Cell Calcium* 21: 175–183.
66. Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P (2009) Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 25: 1463–1465.
67. Doube M, Klosowski MM, Arganda-Carreras I, Cordelières FP, Dougherty RP, et al. (2010) BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*.
68. Bolte S, Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213–232.
69. Platel JC, Dupuis A, Boisseau S, Villaz M, Albrieux M, et al. (2007) Synchrony of spontaneous calcium activity in mouse neocortex before synaptogenesis. *Eur J Neurosci* 25: 920–928.
70. Mailly P, Charpier S, Mahon S, Menetrey A, Thierry AM, et al. (2001) Dendritic arborizations of the rat substantia nigra pars reticulata neurons: spatial organization and relation to the lamellar compartmentation of striato-nigral projections. *J Neurosci* 21: 6874–6888.

I.3. Discussion

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés à l'excitabilité calcique des astrocytes de la SNr, en condition physiologique et lors d'une dérégulation de la balance glutamate/GABA par la SHF du NST. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'activité calcique spontanée des astrocytes de la SNr. Cette activité est à la fois autonome (*i.e.* indépendante de l'activité neuronale) et dépendante des libérations spontanées de GABA et de glutamate au sein de la SNr. D'autre part, nous avons montré que la stimulation à haute fréquence du NST module ces activités calciques astrocytaires. Plus précisément, la SHF du NST augmente le nombre d'astrocytes actifs. Cet effet passe par l'activation des récepteurs du glutamate, de type AMPA et mGlu et des récepteurs du GABA, de type GABA_A. Ces effets sont dépendants des paramètres de stimulation et ne perdurent pas après l'arrêt de la stimulation.

I.3.1. Considérations méthodologiques

Cette étude a été réalisée en tranches aigües de cerveau de rat. Le modèle de tranche offre de nombreux avantages. Il permet de maintenir les conditions physiologiques nécessaires à la survie, aux activités et aux interactions cellulaires. Cela nous a donc permis d'étudier l'un des aspects de la communication neurone-astrocyte, dans un environnement se rapprochant au mieux des conditions physiologiques. Par ailleurs, le choix du plan de coupe sagittal nous a permis d'étudier les communications entre les neurones et les astrocytes au sein de la SNr, en conservant les influences des boucles subthalamo-nigrale et pallido-nigrale. En effet, les marquages par dépôts de DiI nous ont permis de vérifier l'intégrité, tout au moins partielle, de ces voies de projections. Des expériences complémentaires en électrophysiologie nous ont également permis de nous assurer de leur intégrité fonctionnelle. Ce modèle nous a ainsi assuré un maintien des activités cellulaires (neuronales et astrocytaires) de la SNr, ainsi que des libérations toniques de GABA et de glutamate au sein de cette structure. Afin de moduler ces libérations, nous avons stimulé électriquement le NST à haute fréquence. En condition physiologique, la SHF du NST module la balance entre excitation et inhibition en activant les fibres subthalamo- et pallido-nigrales. Ces effets ont été décrits *in vivo* (Windels et al., 2000; Maurice et al., 2003; Windels et al., 2003) mais également dans un modèle de tranche parasagittale, où la SHF du NST induit des libérations concomitantes de GABA et de glutamate dans la SNr (Bosch et al., 2011). En parallèle, la technique d'imagerie calcique confocale nous a permis d'étudier les variations de concentration calcique intracellulaire au sein des astrocytes, en temps réel. Les cinétiques des mouvements calciques astrocytaires, relativement lentes, sont en effet compatibles avec des temps d'acquisition de l'ordre de la seconde. Par ailleurs, nous avons optimisé les conditions de chargement avec la sonde calcique afin de charger préférentiellement les astrocytes. En effet, grâce à l'identification

spécifique des astrocytes par la SR 101 nous avons établi que dans notre modèle de tranche, les cellules chargées avec le Fluo-4 sont majoritairement des astrocytes (98% des cellules chargées en Fluo-4 ont également capté la SR 101). Ainsi, nos conditions nous ont permis d'étudier les activités calciques des astrocytes, en nous plaçant dans un contexte se rapprochant au mieux des conditions physiologiques et en conservant l'activité des boucles subthalamo- et pallido-nigrales.

I.3.2. Activités calciques des astrocytes de la SNr

Nos résultats révèlent la présence d'activités calciques spontanées dans les astrocytes de la SNr. Des activités du même type avaient également été décrites dans les astrocytes du thalamus, du cortex, de l'hippocampe, du striatum, de l'hypothalamus ou encore de la moelle épinière (Parri et al., 2001; Aguado et al., 2002). Les activités calciques spontanées des astrocytes de la SNr présentent des caractéristiques spatio-temporelles similaires à celles décrites dans la littérature *in vitro* (typologie des signaux calciques, paramètres de fréquence et d'amplitude, proportion d'astrocytes actifs durant les 5 minutes d'enregistrement, implication majoritaire des stocks internes de Ca^{2+}) (Parri et al., 2001; Aguado et al., 2002; Parri and Crunelli, 2003; Wang et al., 2006; Kawamura and Kawamura, 2011). Ces caractéristiques sont également proches de celles décrites *in vivo* dans le cortex et l'hippocampe (Hirase et al., 2004; Sasaki et al., 2011), suggérant que les activités calciques spontanées enregistrées dans la SNr correspondent bien à un phénomène physiologique et que le modèle de tranche n'affecte pas drastiquement leurs caractéristiques spatio-temporelles. Cependant, la particularité des activités calciques spontanées des astrocytes de la SNr est qu'elles ne sont pas totalement autonomes, contrairement à ce qui a été décrit dans les autres structures cérébrales. En effet, environ la moitié d'entre elles est dépendante de l'activité neuronale et notamment des libérations neuronales toniques de GABA et de glutamate. Ainsi, il semblerait qu'en fonction de la structure, les astrocytes présentent différentes caractéristiques leur permettant de s'adapter au mieux à leur environnement local et notamment chimique. Cette adaptation des astrocytes à leur environnement neuronal a également été décrite au niveau du cortex, où les activités calciques spontanées des astrocytes présents dans la couche L1 ou L2/3 du cortex somatosensoriel présentent des caractéristiques différentes (comme la proportion d'astrocytes actifs ou le degré de synchronie entre ces activités) (Takata and Hirase, 2008). En conclusion, les astrocytes de la SNr sont non seulement capables d'être actifs de manière autonome, mais ils sont également « à l'écoute » de leur environnement, caractérisé par des libérations toniques de glutamate et de GABA.

I.3.3. Expression des récepteurs du glutamate et du GABA par les astrocytes de la SNr

Concernant la part des activités calciques spontanées dépendantes de l'activité neuronale, l'activation des astrocytes de la SNr pourrait être due à l'activation des récepteurs astrocytaires de type AMPA, mGlu et GABA_A. Nous avons montré que ces récepteurs sont bien fonctionnels au niveau des astrocytes car l'application d'agonistes de ces récepteurs engendre une réponse calcique astrocytaire, même lorsque l'activité neuronale est inhibée par la TTX. Cette réponse pharmacologique est inhibée par les antagonistes spécifiques des récepteurs AMPA, mGlu ou GABA_A, tout comme l'est en partie l'activité spontanée. En revanche, les antagonistes des récepteurs NMDA n'ont pas d'effet sur la réponse au glutamate. Dans le même sens, l'application de NMDA n'engendre pas de signal calcique ce qui suggère que ces récepteurs ne seraient pas exprimés par les astrocytes de la SNr. Dans d'autres structures, et particulièrement au niveau du cortex, il a été montré que les astrocytes expriment des récepteurs NMDA fonctionnels, dont les caractéristiques diffèrent de celles des récepteurs NMDA neuronaux (notamment, les récepteurs NMDA astrocytaires sont moins sensibles au blocage par l'ion Mg²⁺ ce qui leur permet d'être activés à des potentiels moins dépolarisés que les récepteurs neuronaux) (Lalo et al., 2006; Verkhratsky and Kirchhoff, 2007). On sait également que les récepteurs NMDA sont présents au niveau des neurones nigraux au regard à la fois des projections glutamatergiques et GABAergiques (Gotz et al., 1997; Chatha et al., 2000) et qu'ils sont activés lors d'une transmission subthalamo-nigrale (Ibanez-Sandoval et al., 2006). Dans ce contexte, l'absence de récepteurs du glutamate de type NMDA semblerait être une caractéristique des astrocytes de la SNr.

Nous avons montré que l'application d'agonistes des récepteurs du glutamate ou du GABA induit l'activation des astrocytes de la SNr dans des proportions différentes. En effet, environ 60% des astrocytes sont activés par le glutamate contre seulement 23% pour le GABA. Précisons que cette différence est retrouvée pour différentes gammes de concentration de glutamate et de GABA, ce qui écarte d'hypothèse d'un effet dose-réponse de ces neurotransmetteurs. Cela suggère que ces récepteurs sont exprimés de manière hétérogène par les astrocytes qui pourraient alors être regroupés en différentes sous-populations. Il serait intéressant d'étudier si cette expression est corrélée à des territoires fonctionnels particuliers au sein de la SNr. Nous reviendrons sur ce point par la suite.

I.3.4. Réactivité des astrocytes suite à la SHF du NST

Etant donné que les astrocytes de la SNr sont sensibles aux libérations de glutamate et de GABA dans la SNr, nous avons ensuite étudié l'impact de la modulation de la balance entre ces deux neurotransmetteurs sur les activités calciques astrocytaires. Comme nous l'avons décrit précédemment, la SHF du NST entraîne des augmentations de GABA et du glutamate dans la SNr chez le rat *in vivo* (Windels et al., 2000; Maurice et al., 2003; Windels et al.,

2003; Boulet et al., 2006) ou en tranches sagittales (Bosch et al., 2011). Ces perturbations sont différentes selon les paramètres d'amplitude ou de fréquence de la stimulation.

Dans ce contexte, nous avons montré que, à 100 Hz et 200-400 μ A, la SHF du NST augmente significativement de 1,5 fois la proportion d'astrocytes actifs au sein de la SNr. Cet effet n'est pas dû à un effet volumique de la stimulation mais bien à une stimulation des neurones subthalamiques et des fibres subthalamo- et pallido-nigrales car il est inhibé par l'ajout de TTX dans le bain. De plus, l'arrêt de la SHF du NST entraîne un retour de la proportion d'astrocytes actifs à l'état basal ce qui suggère que l'activation supplémentaire d'astrocytes nigraux est un phénomène transitoire et lié à la stimulation. D'autre part, cet effet implique l'activation des récepteurs glutamatergiques et GABAergiques de type AMPA, mGlu et GABA_A, puisque leur blocage respectif diminue les effets de la stimulation et que leur blocage collectif simultanément inhibe ces effets (dans ces conditions, la proportion d'astrocytes actifs résiduelle reflète la part autonome des activités calciques). Cependant, les effets de la stimulation sur l'activité astrocytaire pourraient également passer par l'activation de récepteurs au niveau neuronal et être la sommation d'effets directs et indirects.

Enfin, les effets de la SHF du NST sur les astrocytes sont dépendants des paramètres de la stimulation puisqu'ils ne sont pas retrouvés pour toutes les gammes de fréquence ou d'amplitude. De manière intéressante, il semble que ces effets se manifestent essentiellement dans une fenêtre d'amplitude de 200 à 400 μ A et pour une fréquence d'environ 100 Hz. L'importance des paramètres de stimulation a été démontrée dans différentes études en conditions physiologiques. Les libérations de GABA et de glutamate dans la SNr sont, par exemple, dépendantes de la fréquence de stimulation avec une augmentation de la libération de glutamate maximale à 130 Hz, alors que la libération de GABA continue à augmenter jusqu'à 350 Hz (Windels et al., 2003). L'amplitude de la stimulation influence également les effets de la SHF du NST. Il a été montré *in vivo* qu'une stimulation de faible intensité (20 à 80 μ A) induit principalement une libération de GABA alors que le glutamate est le principal neurotransmetteur libéré à de plus fortes intensités de stimulation (100 à 240 μ A) (Maurice et al., 2003). Dans un modèle similaire au nôtre, il a été montré que l'intensité de la stimulation peut également influencer la réponse des neurones de la SNr à la SHF du NST. Clémentine Bosch et collaborateurs (2011) ont mis en évidence la présence d'une réponse synaptique complexe (présentant une composante excitatrice et inhibitrice) dans les neurones de la SNr lors de la SHF du NST. Dans cette étude, les auteurs démontrent que l'amplitude de la réponse synaptique augmente avec l'intensité de stimulation et que dans certains cas, l'augmentation de l'intensité inverse la prépondérance de l'une ou de l'autre des composantes (Bosch et al., 2011). Dans notre étude, la stimulation à basse intensité (<100 μ A) a conduit à une diminution significative du nombre d'astrocytes actifs. Différentes hypothèses pourraient expliquer cet effet inhibiteur de la stimulation. La stimulation à basse intensité pourrait activer

préférentiellement les fibres GABAergiques pallido-nigrales (Maurice et al., 2003) aboutissant à une inhibition des neurones nigraux. Ceci se traduirait par une diminution de la libération de GABA par les collatérales d'axones nigraux, diminuant ainsi la proportion d'astrocytes activés par le GABA. Cependant, cette diminution de production locale de GABA serait compensée par la libération augmentée de GABA provenant des afférences pallido-nigrales et l'effet global serait probablement nul. L'effet inhibiteur de la stimulation sur l'activité astrocytaire pourrait également être la conséquence d'une inhibition de l'activité neuronale du NST comme il a été observé pour des stimulations de faibles amplitudes (Magarinos-Ascone et al., 2002; Garcia et al., 2003). Dans ce cas là, on aboutirait à une diminution de la libération de glutamate au sein de la SNr et à une diminution consécutive de la libération de GABA par les collatérales intranigrales aboutissant à une diminution de la proportion d'astrocytes activés par le glutamate et le GABA. Ces deux hypothèses ne sont cependant pas exclusives l'une de l'autre.

En conclusion, l'effet de la SHF du NST sur l'activité astrocytaire semble dépendre des paramètres d'amplitude et de fréquence de la stimulation ce qui pourrait refléter les différences retrouvées au niveau neuronal. Enfin, il est intéressant de noter que les paramètres pour lesquels les astrocytes sont activés par la SHF du NST correspondent à ceux utilisés en clinique. De manière très spéculative, ceci nous permet d'imaginer une potentielle implication des astrocytes dans les effets thérapeutiques de la SHF du NST.

I.3.5. Conclusion

Dans cette première partie, nous avons donc mis en évidence que les astrocytes de la SNr possèdent une activité calcique spontanée dont une part est autonome et qu'ils sont également à l'écoute de leur environnement. En effet, ils sont sensibles aux libérations toniques de glutamate et de GABA et la moitié de leurs activités calciques spontanées est totalement dépendante de ces libérations. Enfin, la modulation de la balance entre excitation et inhibition imposée par la SHF du NST augmente le nombre d'astrocytes actifs. L'ensemble de ces informations laisse supposer que les astrocytes sont impliqués dans la régulation de l'activité de la structure de sortie des GB et dans les effets de la SHF du NST. Cependant, cette étude ne traite que d'une seule direction de la communication neurone-astrocyte et il nous a semblé important de savoir si, en retour, les astrocytes peuvent agir sur la régulation de l'activité neuronale nigrale. La suite de cette étude sera donc consacrée à cet aspect de la communication entre les astrocytes et les neurones de la SNr.

II Les astrocytes de la SNr régulent l'activité neuronale spontanée nigrale.

II.1. Introduction

Le concept de la synapse tripartite (Araque et al., 1999) a permis d'introduire un nouveau modèle du fonctionnement de la synapse dans lequel les astrocytes exercent un rôle modulateur de l'activité neuronale. Au sein de cette synapse, les éléments neuronaux pré- et post-synaptiques sont enveloppés par l'astrocyte et les interactions entre ces compartiments cellulaires sont bilatérales. La régulation de l'activité neuronale par l'astrocyte peut alors s'effectuer de différentes manières. Lors d'une transmission synaptique, le neurotransmetteur peut être recapté par l'astrocyte qui participe alors au contrôle de la durée et de la puissance d'action du neurotransmetteur dans la fente synaptique (Schousboe, 2003; Eulenburg and Gomeza, 2010). En régulant l'homéostasie ionique, et notamment celle du K^+ , l'astrocyte contrôle l'excitabilité membranaire neuronale (Kofuji and Newman, 2004; Bay and Butt, 2012). En parallèle, la transmission synaptique peut aboutir à une activation de l'astrocyte grâce à l'activation des récepteurs astrocytaires aux neurotransmetteurs (Porter and McCarthy, 1997; Verkhratsky et al., 1998) et générer un signal calcique intracellulaire (Cornell-Bell et al., 1990). Ce signal calcique peut être à l'origine de différents phénomènes comme, par exemple, la libération de gliotransmetteurs, qui permettront de réguler l'excitabilité neuronale ou la transmission synaptique (Volterra and Meldolesi, 2005; Perea et al., 2009; Halassa and Haydon, 2010).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'activité neuronale de la SNr est un phénomène extrêmement finement régulé, et ce à différents niveaux. Cette régulation est cruciale pour l'intégration et la transmission des informations de l'ensemble du réseau des GB. Dans ce contexte, le rôle des astrocytes dans la régulation de cette activité nigrale est une question majeure qui n'a jamais été explorée.

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence que les astrocytes de la SNr sont spontanément actifs. Nous avons montré que leurs activités calciques spontanées sont à la fois autonomes et à la fois dépendantes de l'activité neuronale, notamment des libérations de GABA et de glutamate. Ces résultats indiquent que les astrocytes de la SNr sont actifs et à l'écoute de leur environnement en conditions basales. L'aspect habituellement bidirectionnel de la communication neurone-glie laisse penser, qu'en retour, les astrocytes de la SNr

pourraient avoir un impact sur l'activité neuronale. Afin d'approfondir cette hypothèse, nous avons choisi de répondre à 2 questions :

- L'activité de recapture des astrocytes est-elle impliquée dans la régulation de l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr ?
- L'activité calcique spontanée que nous avons préalablement caractérisée est-elle impliquée dans la régulation de l'activité neuronale? Si tel est le cas, ces activités sont-elles à l'origine d'une libération de gliotransmetteurs impliqués dans la régulation de l'activité neuronale nigrale ?

II.2. Résultats

II.2.1. Caractérisation électrophysiologique des neurones et des astrocytes de la SNr

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé des techniques électrophysiologiques nous permettant de mesurer l'activité électrique neuronale. L'enregistrement de l'activité de décharge spontanée des neurones GABAergiques de la SNr a été réalisé grâce à la technique du patch-clamp, en configuration cellule attachée ou cellule entière. La configuration cellule attachée permet de préserver le milieu cytoplasmique et respecte au mieux les phénomènes de « firing » spontanés (Perkins, 2006). Nous avons donc opté pour cette configuration, excepté pour les expériences nécessitant la diffusion de biocytine dans le milieu intracellulaire qui ont été réalisées en configuration « cellule entière ». La SNr est composée principalement de neurones GABAergiques mais contient également quelques neurones dopaminergiques. Chez le rat, on estime le ratio neurones dopaminergique/GABAergique à 0.11 ± 0.02 (Nair-Roberts et al., 2008). La différenciation de ces deux types neuronaux a été effectuée sur la base de leurs critères électrophysiologiques. En effet, les neurones GABAergiques présentent un potentiel d'action de plus grande amplitude (69.62 ± 1.65 mV *versus* 66.61 ± 2.48 mV) et de plus courte durée (1.17 ± 0.04 ms *versus* 2.64 ± 0.24 ms) que les neurones dopaminergiques. Ces neurones présentent également un seuil d'émission du potentiel d'action plus négatif (-51.41 ± 0.79 mV *versus* -41.48 ± 2.01 mV) et une fréquence de décharge plus élevée (11.45 ± 1.05 Hz *versus* 2.85 ± 0.46 Hz) (table 5).

	Neurones GABAergiques	Neurones dopaminergiques	Astrocytes
Ri (mΩ)	118.98 ± 5.26	98.90 ± 5.26	25.79 ± 2.11
V _m (mV)	-58.72 ± 0.42	-54.82 ± 0.84	-80.38 ± 0.69
AP _{th} (mV)	-51.41 ± 0.79	-41.48 ± 2.01	
AP _{amp} (mV)	69.62 ± 1.65	66.61 ± 2.48	
AP _{dur} (ms)	1.17 ± 0.04	2.64 ± 0.24	
FR (Hz)	11.45 ± 1.05	2.85 ± 0.46	
	n = 46	n = 11	n = 29

Table 5 : Caractéristiques électrophysiologiques des neurones et des astrocytes de la SNr. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± sem. Ri : input resistance (résistance d'entrée), V_m : potentiel membranaire de repos, AP_{th} : action potential threshold (seuil d'émission du potentiel d'action), AP_{amp} : action potential amplitude (amplitude du potentiel d'action), AP_{dur} : action potential duration (durée du potentiel d'action), FR : firing rate (fréquence de décharge).

La relation courant/potentiel diffère également entre ces deux types neuronaux. Celle-ci a été étudiée en appliquant des sauts hyperpolarisants puis dépolarisants d'une durée de 500 ms, en mode courant imposé. Les neurones dopaminergiques présentent une rectification entrante caractérisée par la présence d'un rebond de dépolarisation (appelé « sag ») lorsqu'ils sont hyperpolarisés, ce qui signifie qu'ils ont une résistance plus forte au début qu'à la fin du saut du courant (figure 36B, flèche). Cette caractéristique est peu présente voire inexistante au niveau des neurones GABAergiques (figure 36A). L'ensemble de ces caractéristiques électrophysiologiques est en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997; Rohrbacher et al., 2000; Atherton and Bevan, 2005; Lee and Tepper, 2007; Ding et al., 2011; Zhou and Lee, 2011).

Concernant les astrocytes, ils présentent des propriétés électrophysiologiques spécifiques (Barres, 1991; Bordey and Sontheimer, 2000; Oberheim et al., 2012) notamment, une résistance d'entrée faible ($25.8 \pm 2.11 \text{ m}\Omega$) et un potentiel de repos membranaire très négatif ($-80.4 \pm 0.69 \text{ mV}$) (table 5). Ces cellules ne sont pas capables d'émettre de potentiels d'action suite à l'injection de courant dépolarisant et possèdent une relation courant/potentiel linéaire (figure 36C).

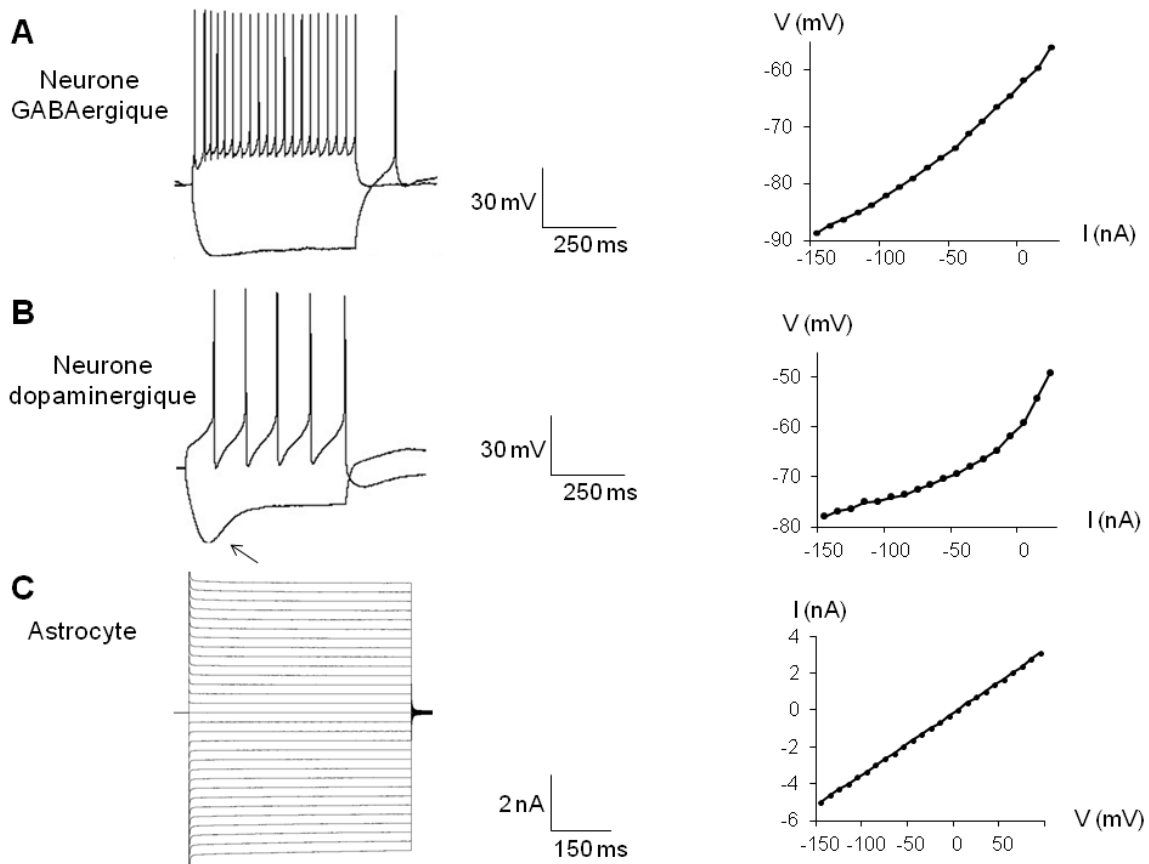


Figure 36: Réponse électrophysiologique des neurones et des astrocytes de la SNr suite à l'injection de courants ou de voltages hyperpolarisants puis dépolarisants. Les panneaux de gauche représentent des enregistrements en mode cellule entière obtenus par l'injection de courant (d'une durée de 500 ms) de -150 à +50 pA (avec des sauts de 10 pA) pour les neurones (A, B) et en imposant différents voltages de -150 à +90 mV (avec des sauts de 30 mV) pour les astrocytes (C). Seules les traces correspondantes à l'injection de -150 et +50 pA sont représentées pour les neurones (A, B). Le "sag" caractéristique des neurones dopaminergiques est indiqué par une flèche. Les courbes courant/potentiel correspondantes sont représentées à droite.

Dans la suite de ce travail, les cellules seront identifiées en fonction des caractéristiques électrophysiologiques décrites ci-dessus.

II.2.2. Impact de la recapture du glutamate et du GABA sur l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr

L'activité neuronale de la SNr est régulée par différents neurotransmetteurs ou neuromodulateurs libérés par les afférences de cette structure. Le glutamate (provenant du NST) et le GABA (provenant du GPe et des collatérales d'axones de la SNr) sont les principaux acteurs de cette régulation dans notre modèle de tranche sagittale. Ces neurotransmetteurs sont libérés de manière tonique en raison de l'activité spontanée du NST, du GPe et de la SNr (Atherton and Bevan, 2005). Dès lors, l'activité de décharge neuronale des neurones nigraux est constamment régulée par la balance glutamate/GABA. Les

astrocytes sont connus pour exprimer des transporteurs du glutamate (GLAST et GLT-1), ainsi que des transporteurs du GABA (GAT1-3) (Danbolt, 2001; Gadea and Lopez-Colome, 2001b, a). Nous avons donc voulu déterminer si, grâce à leur activité de recapture du glutamate et/ou du GABA, les astrocytes pouvaient réguler l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr. Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'impact d'un blocage de la recapture du glutamate ou du GABA sur l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr. Parmi les transporteurs du glutamate, les GLT-1 sont spécifiquement exprimés par les astrocytes alors que les transporteurs du GABA sont également retrouvés au niveau des neurones. Le blocage des GLT-1 par l'acide di-hydrokaïnique (DHK) inhibe donc spécifiquement la recapture glutamatergique astrocytaire mais celui des transporteurs GAT, par l'acide nipécotique (NA), est non spécifique et reflète la recapture GABAergique astrocytaire et neuronale.

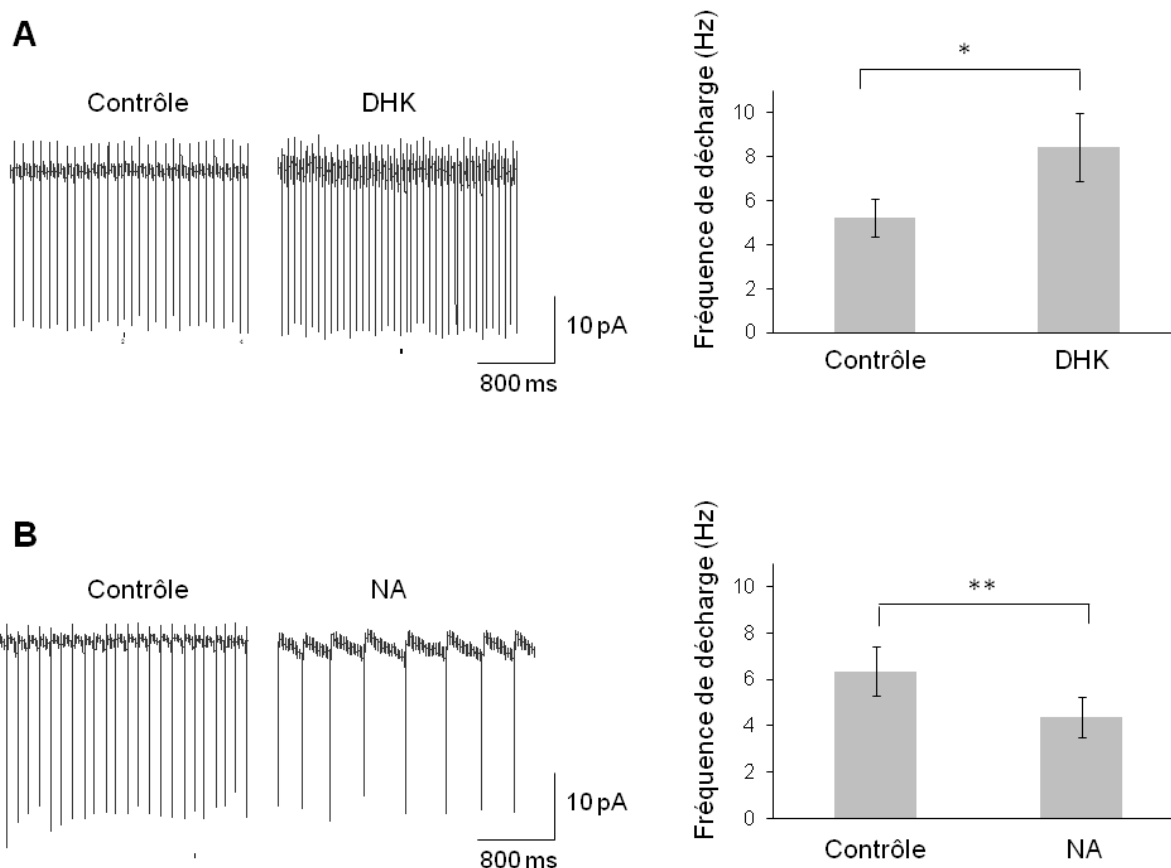


Figure 37 : Impact de la recapture astrocytaire du glutamate ou de la recapture du GABA sur l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr. Les traces de gauche sont des enregistrements en configuration cellule attachée et en mode voltage imposé de l'activité de décharge spontanée d'un neurone de la SNr avant et durant l'application de DHK (A) ou de NA (B). Les histogrammes de droite résument l'ensemble des enregistrements effectué avant et suite à l'application de DHK (A) ou de NA (B). Les valeurs des fréquences sont représentées en moyenne \pm sem. A : $n = 13$ et $p = 0.013$. B : $n = 12$ et $p < 0.001$.

L'activité de décharge spontanée a été enregistrée en configuration cellule attachée et en mode voltage imposé, en maintenant le courant injecté à 0 pA. Dans cette configuration, il n'est pas possible de différencier les neurones GABAergiques des dopaminergiques. C'est pourquoi ces deux types de neurones ont été analysés conjointement. Le DHK (300 μ M) ou le NA (500 μ M) ont été appliqués dans le bain par perfusion. L'activité spontanée basale est enregistrée avant, puis après ajout de l'inhibiteur selon le protocole décrit dans la partie « matériels et méthodes ». La fréquence de décharge enregistrée durant les 5 dernières minutes est alors comparée à celle enregistrée en absence de l'inhibiteur.

Dans ces conditions, l'application de DHK engendre une augmentation significative de la fréquence de décharge des neurones de la SNr d'environ 62% (8.46 ± 1.56 Hz *versus* 5.23 ± 0.84 Hz avant DHK ; $n = 13$; $p = 0.013$) (figure 37A). A l'inverse, l'application de NA entraîne une diminution significative de la fréquence de décharge d'environ 31% (4.36 ± 0.86 Hz *versus* 6.34 ± 1.05 Hz avant NA ; $n = 12$; $p < 0.001$) (figure 37B). Nous avons vérifié au

préalable que les populations cellulaires enregistrées sont homogènes entre les deux groupes (test de Mann-Whitney Wilcoxon; $p = 0.0341$).

Ces données démontrent que les astrocytes modulent la fréquence de décharge des neurones de la SNr *via* leur fonction de recapture du glutamate extracellulaire. La recapture du GABA participe également à cette modulation, cependant nous ne pouvons prétendre que les astrocytes soient les seuls impliqués dans cette recapture.

II.2.3. Modulation de l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr par des phénomènes dépendants de l'activité calcique astrocytaire

Les astrocytes de la SNr sont doués d'une activité calcique spontanée, à la fois autonome et dépendante de l'activité neuronale. Afin d'étudier les conséquences de l'inhibition de ces activités calciques spontanées sur l'activité neuronale de la SNr, nous avons utilisé une approche permettant de bloquer les activités calciques des astrocytes de la SNr et nous avons enregistré l'activité neuronale de manière simultanée.

Afin de bloquer les activités calciques des astrocytes nous avons introduit, *via* la pipette de patch-clamp, un chélateur du calcium (le BAPTA) dans le cytoplasme d'un astrocyte. Le couplage jonctionnel des astrocytes permettra alors la diffusion du BAPTA *via* les jonctions de type gap. Grâce à la technique du double patch-clamp, nous avons enregistré l'activité neuronale de manière simultanée et mesuré ainsi l'impact du blocage de l'activité calcique du réseau astrocytaire sur l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr (figure 38A). Le couple astrocyte-neurone patché n'a jamais été espacé de plus de 200 μm et seuls les neurones de projections GABAergiques ont été inclus dans cette étude (figure 38B). Une fois le couple cellulaire choisi, l'activité de décharge spontanée du neurone a été enregistrée durant 5 minutes. L'astrocyte, jusqu'alors maintenu en configuration cellule attachée, est passé en configuration cellule entière afin de permettre la diffusion du BAPTA 50 mM dans le réseau astrocytaire. Au bout de 30 minutes, l'activité de décharge du neurone est à nouveau enregistrée durant 5 minutes. La fréquence de décharge neuronale est alors comparée à celle enregistrée avant la diffusion du BAPTA. Durant ces expériences, de la biocytine a été ajoutée aux milieux intracellulaires. Cela nous a permis d'évaluer, *a posteriori*, l'étendue du couplage astrocytaire ainsi que sa proximité par rapport au neurone d'intérêt. Afin de permettre la diffusion de la biocytine, les enregistrements de l'activité de décharge neuronale ont été effectués en configuration cellule entière.

Dans un premier temps, nous avons testé la stabilité de la fréquence de décharge en procédant de la même manière que décrit ci-dessus, mais en patchant l'astrocyte avec une solution intracellulaire sans BAPTA. Dans ces conditions, la fréquence de décharge spontanée neuronale n'est pas significativement différente en début et au bout de 30 minutes

d'enregistrement (13.40 ± 1.43 Hz *versus* 12.93 ± 1.69 Hz au début de l'enregistrement; $n = 14$; $p = 0.583$).

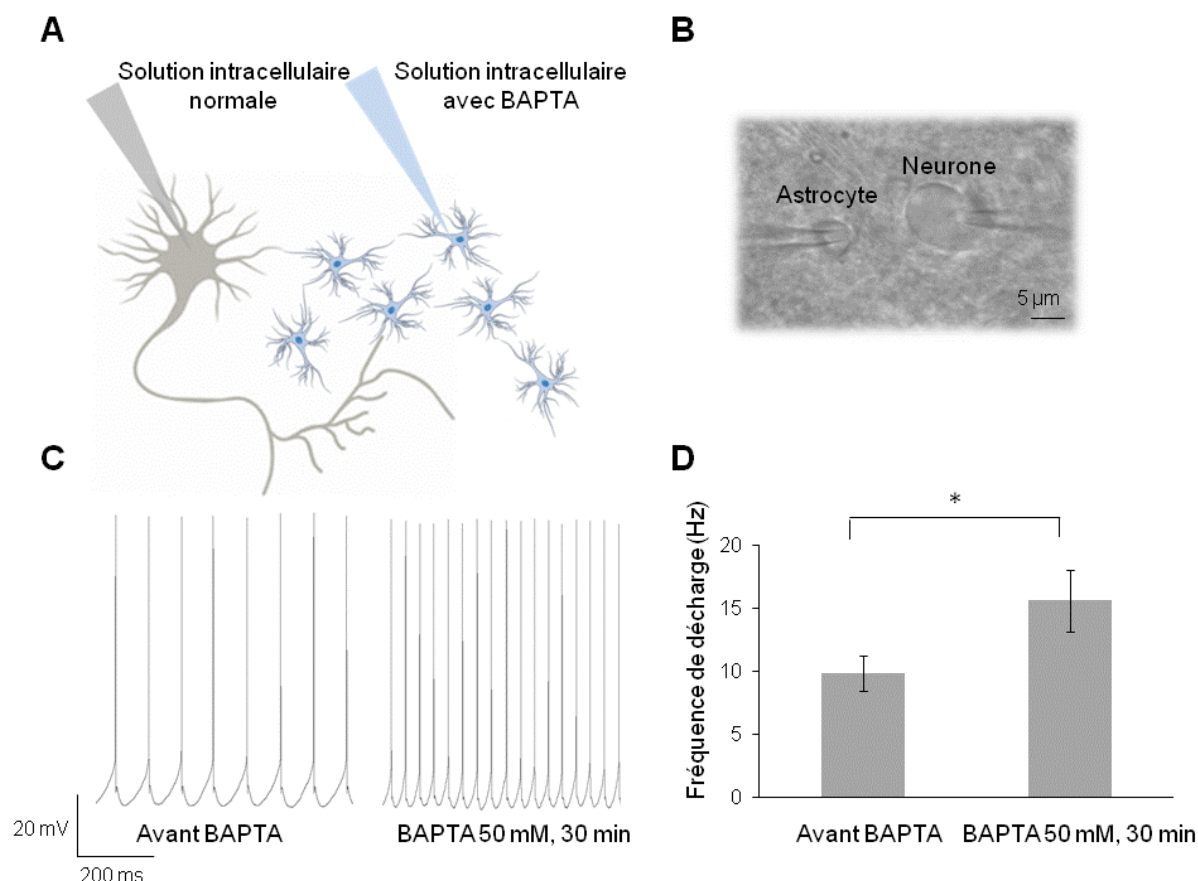


Figure 38: Impact du blocage des activités calciques d'un réseau astrocytaire sur l'activité de décharge spontanée d'un neurone GABAergique de la SNr. A. Représentation schématique du protocole de diffusion du BAPTA dans le réseau astrocytaire. B. Image en microscopie infra-rouge d'un couple astrocyte/neurone GABAergique enregistré dans la SNr. C. Enregistrement de l'activité de décharge spontanée d'un neurone GABAergique de la SNr, en configuration cellule entière et en mode courant imposé, avant et suite à la chélation du calcium par diffusion de BAPTA 50 mM pendant 30 min dans le réseau astrocytaire. D. Histogramme résumant l'ensemble des expériences réalisées. Les valeurs des fréquences de décharge sont représentées en moyenne \pm sem ; $n=13$; $p=0.006$.

Lorsque l'on bloque les activités calciques au sein d'un réseau astrocytaire, on observe une augmentation significative de la fréquence de décharge des neurones d'environ 59% (15.62 ± 2.44 Hz *versus* 9.85 ± 1.37 Hz avant la diffusion ; $n = 13$; $p = 0.006$) (figure 38D). Nous avons vérifié l'homogénéité des fréquences enregistrées durant les 5 premières minutes pour les 2 groupes précédents (en condition contrôle sans BAPTA, ou avant la dialyse de BAPTA). Ces fréquences ne sont pas significativement différentes (test de Mann-Whitney Wilcoxon; $p = 0.139$).

En parallèle, l'ajout de biocytine dans le milieu intracellulaire nous a permis d'évaluer différents paramètres comme le nombre d'astrocytes couplés au sein du même réseau, l'aire de ce réseau et sa taille par rapport à celle de la SNr (figure 39). Nous avons ainsi mis en évidence qu'au sein de la SNr, le couplage astrocytaire est important puisque en 30 minutes environ 153.83 ± 37.64 astrocytes ont été marqués par la biocytine, sur une surface représentant environ un tiers de la surface totale de la SNr ($n = 6$).

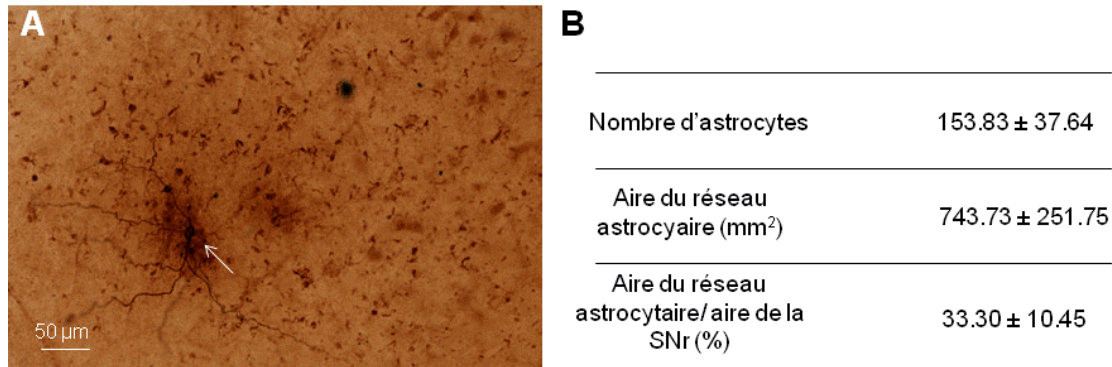


Figure 39 : Evaluation de différents paramètres du réseau astrocytaire au sein de la SNr par diffusion de biocytine. A Exemple de diffusion de la biocytine dans le réseau astrocytaire (ici 230 astrocytes) et dans le neurone « patché » (flèche). B. Paramètres du réseau astrocytaire couplé (aire totale du réseau, nombre d'astrocytes dans le réseau et surface du réseau par rapport à la surface totale de la SNr). Les résultats sont représentés en moyennes \pm sem ($n = 6$).

Nous avons également évalué l'impact du blocage des activités calciques astrocytaires sur certaines propriétés électrophysiologiques comme le seuil d'émission du potentiel d'action, l'amplitude de l'hyperpolarisation post-potentiel d'action (AHP) ou la durée nécessaire à l'atteinte du maximum de cette amplitude (TTP pour Time To Peak) (table 6). Lorsque l'on compare ces paramètres dans l'ensemble des enregistrements ($n = 13$), aucune différence significative n'est mise en évidence (table 6).

	Neurones GABAergiques avant dialyse de BAPTA	Neurones GABAergiques après dialyse de BAPTA	
AP_{th} (mV)	-48.34 ± 1.15	-44.32 ± 2.73	ns
AHP_{amp} (mV)	10.20 ± 0.82	8.98 ± 1.25	ns
AHP_{TTP} (ms)	20.38 ± 2.41	17.38 ± 2.64	ns
FR (HZ)	9.85 ± 1.37	15.62 ± 2.44	p = 0.006

Table 6: Effet de la diffusion du BAPTA dans le réseau astrocytaire sur les paramètres électrophysiologiques des neurones GABAergiques de la SNr. Les valeurs des différents paramètres sont exprimées en moyenne ± sem. FR : firing rate (fréquence de décharge), AP_{th} : action potential threshold (seuil d'émission du potentiel d'action), AHP_{amp} : after hyperpolarisation amplitude (amplitude de l'AHP), AHP_{TTP} : after hyperpolarisation time to peak (durée nécessaire à l'atteinte du maximum de l'AHP_{amp}).

L'ensemble de ces résultats démontre qu'en conditions basales, c'est-à-dire en condition physiologique et en absence d'une stimulation externe, les astrocytes sont capables de réguler l'activité de décharge neuronale *via* un mécanisme dépendant du calcium. Plus précisément, cette régulation conduit à une diminution significative de la fréquence de décharge spontanée des neurones de projection de la SNr.

II.2.4. Régulation de l'activité de décharge spontanée neuronale par l'adénosine

Nous avons donc montré que les astrocytes de la SNr peuvent réguler l'activité neuronale *via* un mécanisme dépendant de l'excitabilité calcique astrocytaire et que cette régulation tend à diminuer la fréquence de décharge neuronale spontanée. Parmi les fonctions dépendantes du calcium qui permettent de réguler l'activité neuronale, la gliotransmission occupe une place importante (Santello et al., 2012). Dès lors, les activités calciques spontanées des astrocytes de la SNr pourraient peut-être être à l'origine d'une libération de gliotransmetteur(s) dont l'action permettrait de diminuer la fréquence de décharge des neurones nigraux. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé une approche pharmacologique en ciblant certains récepteurs susceptibles d'être impliqués dans un tel mécanisme.

Au niveau de la SNr et dans notre modèle de tranche, cette diminution de l'activité neuronale pourrait se faire selon différents mécanismes : en diminuant la transmission glutamatergique subthalamo-nigrale, en potentialisant la transmission GABAergique pallido-nigrale ou *via* une action directe sur des récepteurs post-synaptiques responsables d'une hyperpolarisation des neurones nigraux.

En raison de la diversité de récepteurs aux neurotransmetteurs exprimés par les neurones de la SNr, de nombreux gliotransmetteurs pourraient être impliqués. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, l'activité des neurones nigraux est régulée par le glutamate, le GABA, la dopamine, l'adénosine, les eCB, l'acétylcholine, l'histamine, la sérotonine ou encore la taurine [pour revue voir (Zhou and Lee, 2011)]. Plusieurs d'entre eux pourraient être libérés par les astrocytes dont le glutamate (Parpura et al., 1994), le GABA (Angulo et al., 2008), l'ATP (Wang et al., 2000) les eCB (Walter et al., 2002) ou encore la taurine (Vitvitsky et al., 2011).

Concernant la régulation de la transmission pallido-nigrale, l'activation des différents récepteurs situés au niveau pré-synaptique de type GABA_B (Boyes and Bolam, 2003), mGluRI et III (Marino et al., 2001; Wittmann et al., 2001b) ou D4 (Acosta-Garcia et al., 2009) sont systématiquement responsables d'une diminution de la transmission GABAergique, ce qui n'est pas compatible avec une diminution de la fréquence de décharge des neurones nigraux. A l'inverse, la transmission glutamatergique peut être augmentée ou diminuée (Zhou and Lee, 2011), c'est pourquoi nous avons étudié en priorité cette transmission.

Parmi les différents gliotransmetteurs potentiellement impliqués dans la diminution de cette transmission, nous avons cherché quels étaient ceux qui pourraient entraîner une diminution de la fréquence de décharge neuronale. Les eCB et l'ATP sont ceux qui ont retenu notre attention pour les raisons suivantes :

- Les récepteurs des eCB ont été décrits au niveau pré-synaptique des terminaisons subthalamo-nigrales où leur activation génère une diminution de la transmission glutamatergique (Szabo et al., 2000). Libérés de façon spontanée au niveau de ces synapses, les eCB pourraient alors permettre de diminuer la fréquence de décharge des neurones (figure 40A).
- Concernant l'ATP, une fois libéré par les astrocytes, il va rapidement être dégradé en adénosine dans le milieu extracellulaire (Cunha, 2008) qui pourra alors agir de deux façons : en diminuant la transmission glutamatergique *via* l'activation de récepteurs de type A₁ situés au niveau pré-synaptique ou en potentialisant la transmission GABAergique *via* les récepteurs de type A_{2A} également localisés au niveau pré-synaptique. Les récepteurs de type A₁ ont été décrits au niveau pré-synaptique des terminaisons subthalamo-nigrales où leur activation engendre une diminution de la transmission glutamatergique (Shen and Johnson, 1997). La présence des récepteurs de type A_{2A} dans la SNr est très peu documentée mais nous avons tout de même étudié l'implication de ces récepteurs (figure 40A).

Afin d'élucider le rôle des eCB et de l'adénosine dans la SNr, nous avons étudié l'impact d'un blocage des récepteurs de ces transmetteurs sur la fréquence de décharge des neurones

GABAergiques, en condition basale. Les récepteurs des eCB de type CB1 ont été bloqués par application d'AM261 (3 μ M). Les récepteurs de l'adénosine de type A₁ et A_{2A} ont été bloqués par application de DCPCX (100 nM) et SCH58261 (50 nM) respectivement. Les agents pharmacologiques ont été appliqués dans le bain par perfusion. De même que pour les études précédentes, nous avons enregistré la fréquence de décharge avant, puis après l'ajout de l'inhibiteur. La fréquence de décharge des 5 dernières minutes a alors été comparée à celle des 5 premières minutes précédant l'ajout de l'inhibiteur.

Les fréquences de décharge enregistrées avant l'application des antagonistes dans les différents groupes ont été comparées entre elles et ne sont pas significativement différentes (ANOVA à un facteur; $p = 0.652$). Ces valeurs ont donc été rassemblées pour ne former qu'un seul groupe contrôle (figure 40B).

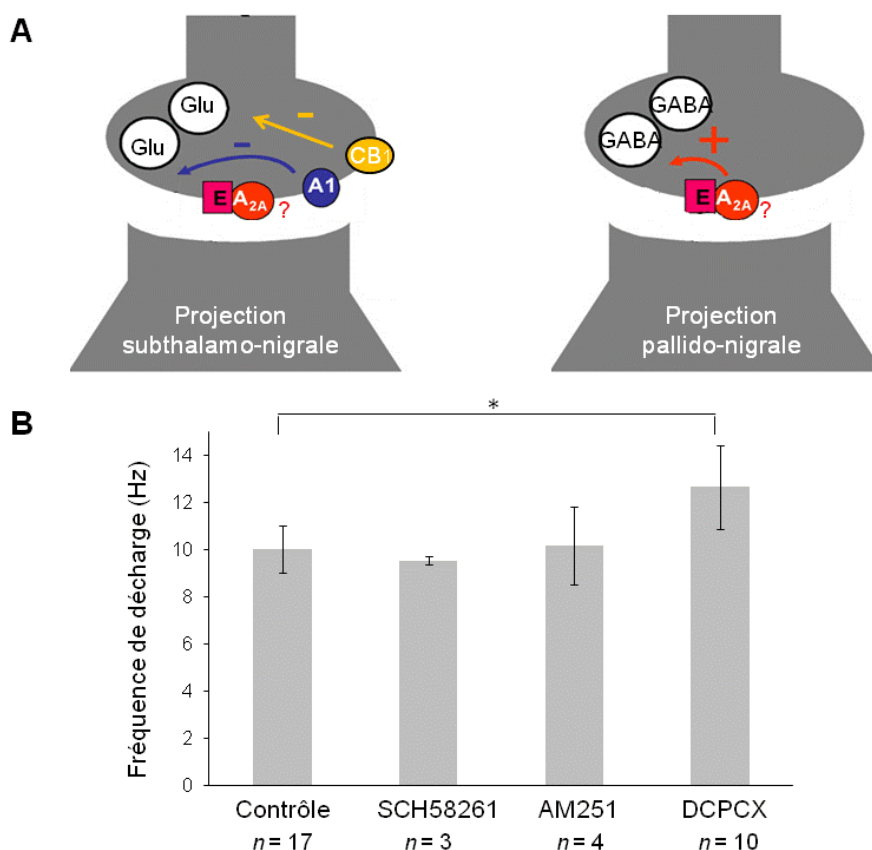


Figure 40: Impact de l'application d'antagonistes spécifiques des récepteurs de l'adénosine ou des endocannabinoïdes sur la fréquence de décharge spontanée des neurones GABAergiques de la SNr. A. Représentation schématique de l'expression des récepteurs de type CB1, A₁ et A_{2A} au niveau des synapses subthalamo- et pallido-nigrale ainsi que l'effet de l'activation de ces récepteurs. Noter que l'expression des récepteurs de type A_{2A} reste hypothétique. Modifié d'après Cunha et al., 2008. B. Histogramme des fréquences de décharge spontanée des neurones GABAergiques de la SNr enregistrées en condition contrôle ou lors de l'application d'antagoniste des récepteurs de l'adénosine de type A_{2A} (SCH58261, 50 nM), A₁ (DCPCX, 100 nM) ou des récepteurs aux eCB de type CB1 (AM251, 3 µM). Les valeurs des fréquences sont représentées en moyenne ± sem.

L'application d'antagoniste des récepteurs de type CB1 n'induit pas de modification de la fréquence de décharge spontanée des neurones GABAergiques nigraux (10.19 ± 1.64 Hz *versus* 9.99 ± 3.47 Hz avant AM261 ; $n = 4$; $p = 0,875$). Précisons cependant que, vu le faible nombre d'enregistrements, ces résultats restent préliminaires et nécessitent d'être confirmés. Concernant le blocage des récepteurs de l'adénosine de type A_{2A}, le nombre d'enregistrements ne nous permet pas de conclure quant à l'implication de ces récepteurs. Il semblerait cependant que l'application d'antagoniste ne modifie pas la fréquence de décharge des neurones (9.56 ± 0.19 Hz *versus* 7.35 ± 1.26 Hz avant SCH58261 ; $n = 3$). Par contre, lorsque l'action de l'adénosine sur les récepteurs de type A₁ est inhibée, la fréquence de décharge neuronale est significativement augmentée d'environ 26% (12.67 ± 1.78 Hz *versus* 9.90 ± 1.54 Hz avant DPCPX ; $n = 10$; $p = 0.002$) (figure 40B).

Ces résultats suggèrent que l'adénosine agit de manière tonique sur les récepteurs de type A₁ et que l'activation de ces récepteurs entraîne une diminution de la fréquence de décharge des

neurones GABAergiques de la SNr. Nous pouvons imaginer que l'adénosine pourrait agir sur les récepteurs de type A_1 situés au niveau pré-synaptique des terminaisons subthalamo-nigrales diminuant ainsi la libération de glutamate. Concernant l'activation des récepteurs de type A_{2A} , nos résultats ne nous permettent pas de nous prononcer sur leur implication dans la régulation de l'activité neuronale nigrale en condition basale.

II.3. Discussion

Dans cette seconde partie de mon travail de thèse, je me suis intéressée à un autre versant de la communication neurone-astrocyte, c'est-à-dire à la régulation de l'activité neuronale par certaines fonctions astrocytaires. J'ai focalisé mon étude sur deux types de fonctions astrocytaires liées 1) à l'activité de recapture et 2) à l'activité calcique astrocytaire. J'ai ainsi mis en évidence que les astrocytes de la SNr régulent la fréquence de décharge spontanée des neurones nigraux au moins de deux façons : *via* la recapture de glutamate et probablement de GABA extracellulaire et *via* un mécanisme dépendant du calcium. En parallèle, nous avons montré qu'un blocage des récepteurs de l'adénosine de type A_1 entraîne une augmentation de la fréquence de décharge des neurones de la SNr. Cet effet étant similaire à celui obtenu par le blocage des activités calciques astrocytaires, il est possible d'imaginer que ces deux phénomènes soient liés. De manière spéculative, nous pouvons donc émettre l'hypothèse suivante : les astrocytes de la SNr pourraient être responsables d'une libération d'ATP de manière calcium dépendante. L'ATP serait alors convertie en adénosine une fois dans le milieu extracellulaire et pourrait activer les récepteurs de type A_1 situés au niveau pré-synaptique des terminaisons subthalamo-nigrales. Cette activation conduirait alors à une diminution de la libération tonique de glutamate.

II.3.1 Considérations méthodologiques

L'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr a été étudiée en tranches parasagittales qui, comme nous l'avons mentionné dans la première partie de ce travail, permet de conserver les activités neuronales spontanées, les activités astrocytaires et les libérations toniques de GABA et glutamate dans la SNr. L'enregistrement de l'activité neuronale a été effectué grâce à la technique du patch-clamp. Cette technique apporte de nombreuses informations concernant les propriétés électrophysiologiques des cellules et permet d'étudier les activités neuronales dans le détail.

L'étude de la recapture astrocytaire a été étudiée *via* l'application d'inhibiteur des transporteurs. Le DHK étant spécifique des transporteurs GLT-1, cela nous a permis de cibler la recapture astrocytaire du glutamate. Cependant, il est important de préciser que ces cellules expriment d'autres types de transporteurs du glutamate. Ainsi, il est possible que l'intégralité

de la recapture astrocytaire du glutamate n'ait pas été totalement inhibée et que la part astrocytaire de cette recapture ait alors été sous-estimée. Les transporteurs du GABA (GAT1-3) sont exprimés à la fois par les astrocytes et les neurones dans des proportions différentes. Les GAT-1 semblent être exprimés préférentiellement par les neurones, les GAT-3 par les astrocytes alors que les GAT-2 sont surtout retrouvés au niveau des méninges, du plexus choroïde ou des cellules épendymaires (Gadea and Lopez-Colome, 2001b). L'expression majoritaire des GAT-3 par les astrocytes a été mise en évidence au niveau du cortex, du rhombencéphale, du télencéphale et des ganglions de la base (Ng et al., 2000; Pow et al., 2005). Au vu de ces informations, il semble probable que les astrocytes de la SNr expriment préférentiellement les GAT-3 mais l'expression des autres transporteurs n'est pas à exclure, de même que la localisation de GAT-3 au niveau neuronal. L'acide nipécotique utilisé dans cette étude est considéré comme un inhibiteur non spécifique même s'il présente une affinité plus importante pour les GAT-1 (IC_{50} : $24 \pm 6 \mu M$ pour GAT-1, $113 \pm 33 \mu M$ pour GAT-2 et $159 \pm 30 \mu M$ pour GAT-3) (Borden, 1996). Cette action non spécifique nous a permis de bloquer tous les types de transporteurs du GABA, sans spécificité cellulaire.

Le blocage des variations intracellulaires de calcium a été réalisé *via* la diffusion d'un chélateur du calcium (le BAPTA) dans le milieu cytoplasmique de l'astrocyte. Le couplage jonctionnel entre plusieurs astrocytes permet la diffusion du BAPTA (476.43 Da) dans tout le réseau astrocytaire couplé. Une étude récente a suggéré que la chélation du calcium par le BAPTA ne permettrait pas de bloquer les augmentations de calcium rapides et restreintes au niveau de microdomaines cellulaires. Une alternative à ce problème serait de fixer la concentration intracellulaire de calcium en appliquant de l'EGTA (chélateur calcique) combiné à une concentration fixe de calcium [« calcium-clamp »; (Henneberger et al., 2010)]. Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser la diffusion de BAPTA car nous voulions inhiber les variations de calcium globales et ce dans un réseau étendu, à l'image de ce qui a été mis en évidence dans d'autres études similaires (Serrano et al., 2006; Benedetti et al., 2011; Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011; Poskanzer and Yuste, 2011; Navarrete et al., 2012). De plus, la concentration de BAPTA que nous avons utilisée (50 mM) nous permet de chélater la majeure partie du calcium libre intracellulaire, quelle que soit l'amplitude des événements calciques et ce, même à distance de l'astrocyte patché. Grâce à la technique du double patch-clamp, nous avons ainsi pu étudier l'impact d'un blocage des fonctions astrocytaires dépendantes du calcium sur l'activité de décharge neuronale. Cependant, la mise en œuvre de cette technique implique de bien choisir le couple neurone-astrocyte. En effet, le choix de l'astrocyte patché (et par conséquent le réseau au sein duquel l'activité calcique sera bloquée), ne sera pas le même si les synapses sont situées au niveau du soma ou au niveau des dendrites distales. Cette information est d'autant plus importante si le réseau astrocytaire n'est pas étendu. Dans le cas de la SNr, les synapses subthalamo-nigrales sont essentiellement retrouvées au niveau des dendrites distales et proximales, les synapses striato-nigrales sont

retrouvées au niveau des dendrites distales alors que les synapses pallido-nigrales forment de larges paniers autour du soma et des dendrites proximales (Smith and Bolam, 1991; von Krosigk et al., 1992). Ces informations indiquent que, dans nos tranches, le GABA est libéré au niveau du soma et des dendrites proximales et le glutamate au niveau distal et proximal. C'est pourquoi nous avons choisi des couples cellulaires espacés de moins de 200 μm et que nous avons vérifié systématiquement la position du réseau astrocytaire par rapport au soma et à l'arbre dendritique du neurone patché. D'autre part, il n'existe aucune information concernant l'étendu et le type de synapse tripartite dans la SNr : l'enrobage astrocytaire est-il retrouvé au niveau des synapses asymétriques ? Symétriques ? Les deux ? Par ailleurs, dans l'hypothèse où les deux types de synapses seraient tripartites, l'astrocyte agit-il de façon homo- ou hétéro-synaptique ?

La diffusion de la biocytine dans le réseau astrocytaire nous a permis d'évaluer le couplage des astrocytes au sein de la SNr. La biocytine est légèrement plus petite que le BAPTA (372.48 Da et 476.43 Da respectivement) suggérant une diffusion plus large, mais les marquages nous donnent tout de même une idée de l'étendue du réseau affecté par le BAPTA. Utilisée dans d'autres structures, cette technique a permis d'obtenir des informations sur le couplage astrocytaire au niveau du cortex (Houades et al., 2008; Poskanzer and Yuste, 2011), de l'hippocampe (Xu et al., 2010) ou du striatum (Goubard et al., 2011). De manière intéressante, il semblerait que le degré de couplage diffère selon la structure [on compte par exemple 57 ± 14 astrocytes couplés au sein d'un réseau au niveau de la couche IV du cortex somatosensoriel (Houades et al., 2008) contre 222 ± 41 au niveau du striatum (Goubard et al., 2011)]. De plus, il a également été montré que ce paramètre pouvait varier au sein d'une même structure, comme au niveau de l'hippocampe où les astrocytes de la zone CA1 sont plus couplés que ceux de la zone CA3 (des centaines d'astrocytes sont couplés au niveau de CA1 alors que le réseau compte moins de 50 astrocytes au niveau de CA3) (D'Ambrosio et al., 1998). Concernant la SNr, le réseau astrocytaire couplé semble donc être relativement étendu ce qui sous entend qu'un même réseau pourrait être en relation et donc réguler de nombreux neurones. Dans ce contexte, les conséquences d'une inhibition des jonctions communicantes astrocytaires (par de la carbenoxolone), sur l'activité calcique astrocytaire et sur l'activité de décharge neuronale seraient très informatives sur l'importance fonctionnelle du couplage au sein de la SNr. Cependant, il est important de préciser que toutes les cellules couplées ne sont peut être pas des astrocytes puisqu'il existe des couplages hétérotypiques, notamment entre les astrocytes et les oligodendrocytes bien que ceux-ci soient minoritaires [pour revue voir (Theis and Giaume, 2012)].

Afin de discriminer les différents gliotransmetteurs pouvant être éventuellement impliqués dans la régulation de l'activité neuronale, nous avons utilisé une approche pharmacologique. Les inconvénients de ce genre d'approche sont : **1)** qu'elle permet seulement de conclure

quant à l'implication du récepteur dont l'action a été bloquée (ici le récepteur à l'adénosine de type A₁) sans avoir d'information sur l'origine du transmetteur; en l'occurrence, les effets observés dans cette étude pourraient résulter d'une libération d'ATP ou d'adénosine par les neurones et 2) qu'elle bloque l'ensemble des récepteurs sans discriminer les synapses glutamatergiques et GABAergiques ni les structures. Ainsi, l'effet observé suite à l'inhibition des récepteurs de type A₁ pourrait également être la résultante d'effets indirects. A l'inverse, le manque d'effet observé lors de l'inhibition des récepteurs de type CB1 pourrait être expliqué par la présence d'actions antagonistes. Ces récepteurs sont en effet présents au niveau pré-synaptique des terminaisons subthalamo- et striato-nigrales et leur mise en jeu est à l'origine d'une inhibition et d'une activation conjointe des neurones de la SNr (Tersigni and Rosenberg, 1996; Chan et al., 1998; Szabo et al., 2000; Wallmichrath and Szabo, 2002; Matyas et al., 2006). Cependant, la transmission GABAergique striato-nigrale n'étant pas préservée dans notre modèle de tranche, il est peu probable que ce phénomène soit présent dans nos conditions. Ainsi, cette approche nous permet seulement de conclure que les récepteurs de l'adénosine de type A₁ sont impliqués dans la régulation de l'activité de décharge neuronale de la SNr et que leur activation mène à une diminution de la fréquence de décharge.

II.3.2 Impact de l'activité de recapture astrocytaire sur l'activité neuronale de la SNr

Au sein de la synapse tripartite, la recapture astrocytaire occupe une place primordiale dans la régulation de la transmission synaptique. Ce mécanisme permet de moduler l'intensité et la durée de l'activation des récepteurs situés au niveau pré- ou post-synaptique (Tsukada et al., 2005; Tzingounis and Wadiche, 2007), de limiter l'activation des récepteurs extra-synaptiques (Huang and Bergles, 2004) ou encore de limiter la diffusion des neurotransmetteurs vers les synapses voisines (Arnth-Jensen et al., 2002; Takayasu et al., 2005).

En effet, de manière générale, des études ont montré que l'augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate peut mener à une activation des récepteurs métabotropiques situés au niveau pré-synaptique et diminuer la transmission synaptique de glutamate ou de GABA (Scanziani et al., 1997; Piet et al., 2003). Cela peut également augmenter l'amplitude des EPSCs (Carter and Regehr, 2000) ou diminuer cette amplitude suite à la désensibilisation des récepteurs AMPA au niveau du striatum (Goubard et al., 2011). Enfin, certaines études ont montré que la recapture astrocytaire du glutamate était impliquée dans les phénomènes de plasticité à long terme (Oliet et al., 2001; Takasaki et al., 2008) et à court terme (Goubard et al., 2011). Des perturbations de la recapture glutamatergique astrocytaire sont également responsables de phénomènes d'excitotoxicité dont les conséquences peuvent être dramatiques alors que l'invalidation du gène codant pour le transporteur neuronal a des conséquences plus modérées (Rothstein et al., 1996). Certaines études ont ainsi établi un lien entre des perturbations de la recapture du glutamate astrocytaire et diverses pathologies. L'invalidation

du gène codant pour GLT-1 entraîne par exemple des crises d'épilepsie chez la souris (Tanaka et al., 1997). En parallèle, d'importantes diminutions du taux d'expression de GLT-1 ont été mises en évidence au niveau du cortex moteur et de la moelle épinière chez des patients atteints de la sclérose latérale amyotrophique (Rothstein et al., 1995). Concernant la recapture du GABA, les conséquences d'un blocage des transporteurs sont également diverses. L'excès de GABA résultant peut entraîner l'activation des récepteurs du GABA métabotropiques situés au niveau pré-synaptique et diminuer la libération de GABA (Oh and Dichter, 1994; Jensen et al., 2003; Park et al., 2009). A l'inverse, l'action du GABA peut être potentialisée *via* l'activation des récepteurs extra-synaptiques (Jensen et al., 2003; Chiu et al., 2005; Kirmse et al., 2008; Park et al., 2009) ou post-synaptiques (Madsen et al., 2009). Enfin, des perturbations de cette recapture ont également été mises en relation avec certaines pathologies comme l'épilepsie chez la souris, où la surexpression des GAT-1 augmente la susceptibilité de développer des crises induites par injection de kaïnate (Ma et al., 2001). Une fois recaptés, le GABA et le glutamate sont métabolisés puis recyclés grâce au cycle GABA/glutamate/glutamine (Bak et al., 2006). Les mécanismes de recapture permettent donc également de reconstituer les réserves en neurotransmetteurs.

Nos résultats montrent, qu'en recaptant le glutamate extracellulaire (libéré de manière tonique par les afférences du NST), les astrocytes limitent l'action de celui-ci ce qui permet de diminuer la fréquence de décharge neuronale des neurones de la SNr. Ce mécanisme prend probablement toute son importance dans certaines conditions où le glutamate extracellulaire est augmenté au niveau de la SNr. C'est le cas, notamment, lors de la maladie de Parkinson, en raison de l'hyperactivité du NST. Cependant, aucune étude ne fait état de la recapture astrocytaire du glutamate dans la SNr en condition pathologique. Ce mécanisme est-il augmenté afin de compenser l'hyperactivité du NST ou est-il débordé en raison d'une saturation des transporteurs ? Nous reviendrons sur les liens entre la recapture astrocytaire et les conditions pathologiques par la suite.

Les résultats concernant la recapture du GABA ne peuvent pas être interprétés de la même façon. En effet, ils mettent en évidence une recapture constante de GABA extracellulaire et un impact sur la fréquence de décharge spontanée des neurones de la SNr, mais sans pouvoir affirmer que cette recapture est uniquement opérée par les astrocytes. De manière intéressante, nous pouvons également nous interroger sur le rôle de la recapture du GABA dans la MP. En effet, des modifications de l'activité de ces transporteurs pourraient être à l'origine d'une augmentation ou d'une diminution de la recapture du GABA, permettant de diminuer ou de potentialiser l'hyperactivité de la SNr.

Enfin, il serait intéressant de savoir si le glutamate et le GABA sont les seuls neurotransmetteurs recaptés par les astrocytes au sein de la SNr. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, de nombreux neurotransmetteurs sont libérés de manière

tonique dans la SNr et participent à la régulation de son activité neuronale spontanée (comme la dopamine, l'acétylcholine, la sérotonine, la glycine, les eCB...) (Zhou and Lee, 2011). En parallèle, des études ont montré que les astrocytes exprimaient certains transporteurs des neurotransmetteurs dont la dopamine au niveau du cortex ou du striatum (Inazu et al., 1999; Karakaya et al., 2007), la sérotonine au niveau du cortex (Dave and Kimelberg, 1994; Hirst et al., 1998) ou encore la choline également au niveau cortical (Inazu et al., 2005). Précisons cependant que ces études ont été réalisées *in vitro* (en culture cellulaire) et que l'expression de ces transporteurs reste à confirmer dans des conditions plus intégrées. L'étude de la recapture de ces autres neurotransmetteurs et neuromodulateurs serait donc intéressante. Si de tels mécanismes sont décrits, cela ajouterait un niveau de complexité supplémentaire dans la régulation de l'activité neuronale de la SNr.

II.3.3 Impact de l'excitabilité calcique astrocytaire sur l'activité neuronale de la SNr

Dans la partie précédente, nous avons mis en évidence la présence d'activités calciques spontanées dans les astrocytes de la SNr. Grâce à l'approche utilisée ici, nous avons pu étudier l'impact de ces activités calciques sur l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr. Nous avons ainsi montré que le blocage des activités calciques astrocytaires par la diffusion de BAPTA, entraîne une augmentation de la fréquence de décharge neuronale. Autrement dit, grâce à un mécanisme dépendant du calcium, les astrocytes contribuent à diminuer la fréquence de décharge neuronale et ce, en condition basale. La plupart des études concernant l'impact de l'activité calcique astrocytaire sur l'activité neuronale ont mis en évidence un impact de ces activités calciques uniquement lorsque les astrocytes sont activés par une stimulation externe (Serrano et al., 2006; Henneberger et al., 2010; Benedetti et al., 2011; Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011; Poskanzer and Yuste, 2011; Navarrete et al., 2012). L'impact des activités calciques spontanées astrocytaires sur l'activité neuronale en conditions basales n'a été mis en évidence que dans le cortex somatosensoriel (Poskanzer and Yuste, 2011). Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés à l'activité des neurones corticaux dont le potentiel de membrane oscille entre des états dépolarisés (up) et polarisés (down). La diffusion de BAPTA dans le réseau astrocytaire entraîne alors une diminution de l'occurrence des états up (Poskanzer and Yuste, 2011). Nos résultats sont en accord avec cette étude dans le sens où ils démontrent que les activités calciques astrocytaires spontanées peuvent être à l'origine de phénomènes impliqués dans la régulation de l'activité neuronale en condition basale. Cependant, il est important de rappeler que les activités calciques spontanées des astrocytes de la SNr sont à la fois autonomes et dépendantes de l'activité neuronale. Dans notre étude, nous ne sommes pas en mesure d'établir quel type d'activité est impliqué dans la régulation de l'activité neuronale et pourtant, bien que compliquée à résoudre, la question est fondamentale.

Les variations de calcium intracellulaire sont impliquées dans de nombreuses fonctions astrocytaires (Verkhratsky and Kettenmann, 1996; Verkhratsky et al., 1998). Ainsi, la modulation de l'activité neuronale pourrait résulter de différents phénomènes dépendants du calcium dont les effets pourraient être plus ou moins directs comme la transcription de certains gènes, l'activation de certaines cascades de signalisation ou encore la modification de l'expression de certains récepteurs ou transporteurs. Il a par exemple été montré au niveau de l'hippocampe, que l'expression des transporteurs du GABA de type GAT-3 est diminuée lorsque les augmentations de calcium intracellulaire sont bloquées (Shigetomi et al., 2012). Nous pouvons donc imaginer que le blocage des activités calciques des astrocytes de la SNr ait pu modifier l'expression des transporteurs astrocytaires. Cependant, dans cette étude les auteurs s'intéressent à des variations de calcium très localisées (appelées « Spotty Ca^{2+} signal ») et utilisent la technique du « calcium-clamp » (Shigetomi et al., 2012). De tels phénomènes existent-ils dans la SNr ? Si tel est le cas, la diffusion du BAPTA a-t-elle été suffisamment efficace pour bloquer ces variations de calcium restreintes au niveau de micro-domaines ? En parallèle, l'action de certains transporteurs ou échangeurs peut être régulée par le Ca^{2+} . La recapture du K^+ par les astrocytes occupe une place importante dans la régulation de l'excitabilité neuronale et dépend de pompes Na^+/K^+ ATPase ou de canaux potassiques de type K_{IR} (Kofuji and Newman, 2004; Bay and Butt, 2012). Concernant la recapture de K^+ *via* la pompe Na^+/K^+ ATPase, le principal facteur limitant son activité est la concentration intracellulaire de sodium (dont l'augmentation intracellulaire augmente l'activité de la pompe et augmente de ce fait, la recapture du K^+) (Pellerin and Magistretti, 1997; Lupfert et al., 2001). Cette concentration intracellulaire de sodium est en partie régulée par les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ainsi, les augmentations de calcium intracellulaires au sein des astrocytes augmentent l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et par conséquent celle de la pompe Na^+/K^+ ATPase, permettant ainsi la recapture du K^+ . Ce phénomène a été mis en évidence en culture, en tranches au niveau de l'hippocampe et *in vivo* au niveau du cortex chez la souris (Wang et al., 2012). Dans notre étude, la diffusion du BAPTA dans le réseau astrocytaire n'a pas engendré de modifications significatives des paramètres électrophysiologiques neuronaux. Dès lors, nous pouvons imaginer que les effets de la dialyse du BAPTA ne seraient pas liés à des modifications de la conductance ou de l'excitabilité membranaire. C'est pourquoi notre hypothèse s'est portée sur l'un des mécanismes dépendant du calcium les plus étudiés ces dernières années : la gliotransmission.

II.3.4 Hypothèse de la gliotransmission

En partant du postulat que la gliotransmission est un phénomène dépendant du calcium (Araque et al., 2000; Pascual et al., 2005; Panatier et al., 2011; Verkhratsky et al., 2012), nous avons émis l'hypothèse que les activités calciques spontanées des astrocytes de la SNr pourraient être à l'origine d'une libération de gliotransmetteur impliquée dans la régulation de la fréquence de décharge neuronale.

Grâce à une approche pharmacologique, nous avons montré que l'inhibition des récepteurs de l'adénosine de type A_1 conduit aux mêmes conséquences que la dialyse du BAPTA sur la fréquence de décharge des neurones de projection. Cela permet d'émettre l'hypothèse que les activités calciques spontanées des astrocytes pourraient être à l'origine d'une libération d'ATP conduisant à l'activation des récepteurs A_1 suite à l'action d'ecto-nucléotidases.

Cependant, afin de montrer que l'adénosine provient d'une libération d'ATP par les astrocytes et que cette libération est dépendante du calcium [car l'ATP peut être libéré de manière dépendante ou indépendante du calcium (Hamilton and Attwell, 2010)], des études complémentaires seront nécessaires. L'utilisation d'outils permettant de bloquer la libération vésiculaire nous permettrait tout d'abord d'établir si les activités calciques astrocytaires sont bien responsables d'une libération de gliotransmetteurs. Etant donné que la libération vésiculaire par les astrocytes semble être dépendante d'interactions protéiques sensibles à la toxine tétanique (Pascual et al., 2005), il serait possible d'inhiber la gliotransmission en utilisant cette toxine. Cette démonstration a été faite dans un travail réalisé par Aude Panatier et collaborateurs (2011). Dans cette étude, les auteurs mettent tout d'abord en évidence l'implication de fonctions astrocytaires dépendantes du calcium, en utilisant la technique de diffusion du BAPTA dans un astrocyte (ils montrent alors que cette diffusion diminue l'efficacité de la transmission synaptique au niveau de la région CA1 de l'hippocampe chez le rat). L'application d'antagonistes des récepteurs de l'adénosine de type A_{2A} reproduit les effets de la diffusion du BAPTA ce qui suggère une implication de l'adénosine. Enfin, ces auteurs montrent que la diffusion dans un astrocyte du fragment léger de la toxine tétanique (TeTx-LC) mime les effets de la dialyse du BAPTA, ce qui montre que les astrocytes sont responsables d'une libération vésiculaire et probablement d'ATP (Panatier et al., 2011). Dans notre étude, cette méthode pourrait donc nous permettre de faire le lien entre les activités calciques spontanées et la gliotransmission. Cependant, cela ne nous permettrait pas d'établir de lien direct avec l'ATP. Afin de nous assurer que l'ATP est bien responsable des effets observés par la diffusion du BAPTA, il faudrait mettre en évidence qu'une application d'ATP et/ou d'adénosine peut reverser les effets du BAPTA sur la fréquence de décharge neuronale. L'ensemble de ces expériences nous permettrait alors de valider l'hypothèse d'une libération d'ATP dépendante du calcium par les astrocytes.

L'activation des récepteurs de type A_1 , majoritairement situés au niveau pré-synaptique des terminaisons subthalamo-nigrales (Shen and Johnson, 1997), conduit à une diminution de la transmission glutamatergique. Dans le paragraphe I.3.4 des rappels bibliographiques, nous avons décrit le fait que les récepteurs de type A_1 présentent une forte affinité pour l'adénosine et sont activés en première intention lors d'une libération basale (provenant alors majoritairement d'une libération d'ATP par les astrocytes). A l'inverse, lors d'activités à haute fréquence, l'adénosine libérée par les neurones peut activer les récepteurs A_{2A} et mener

à une augmentation de la transmission homo-synaptique conjointement à une diminution de la transmission hétéro-synaptique (Cunha, 2008). L'expression des récepteurs de type A_{2A} n'est pas vraiment établie au niveau de la SNr mais si ces récepteurs sont présents, ils ne seraient peut-être pas activés en conditions basales, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet observée dans cette étude (pour l'instant préliminaire) avec les inhibiteurs des récepteurs de type A_{2A} . Par ailleurs, si tel est le cas, ces récepteurs seraient alors probablement activés lors d'activités neuronales plus soutenues comme lors de la maladie de Parkinson ou lors de la SHF du NST. L'ensemble de ces informations suggère que l'adénosine pourrait avoir un rôle important à jouer dans la régulation de la SNr en condition physiologique *via* l'activation des récepteurs de type A_1 et peut-être en condition pathologique et lors de la SHF du NST *via* l'activation des récepteurs de type A_{2A} .

Enfin, il faut garder à l'esprit que tous les gliotransmetteurs potentiels n'ont pas été investigués dans cette étude. Notamment, la glycine pourrait également être impliquée dans l'effet observé. Tout d'abord, l'activation des récepteurs de la glycine au niveau de la SNr induit une inhibition de l'activité neuronale dans la SNr (Dray et al., 1976; Ye et al., 1997). De plus, une étude a montré que l'origine de la glycine dans la SNr pourrait être astrocytaire (Dopico et al., 2006). Ces informations font de la glycine un bon candidat, dont l'action pourrait également permettre de diminuer la fréquence de décharge des neurones de la SNr.

II.3.5 Conclusion

Les résultats obtenus ici démontrent pour la première fois que les astrocytes jouent un rôle actif dans la régulation de l'activité neuronale de la SNr et ce en condition basale (*i.e.* en absence de toute stimulation externe et en condition physiologique). Cette régulation se fait au moins à deux niveaux, *via* la recapture de glutamate et de GABA extracellulaire et *via* un mécanisme dépendant du calcium, pouvant éventuellement conduire à une libération d'ATP. Grâce à leur activité de recapture, les astrocytes participent ainsi à la régulation de la balance glutamate/GABA, primordiale dans la régulation de l'activité neuronale de la SNr. D'autre part, grâce à leur activité calcique spontanée, ils contribuent à diminuer la fréquence de décharge neuronale de la SNr. L'ensemble de ces résultats montrent pour la première fois, l'implication des astrocytes dans la régulation physiologique de l'activité neuronale de la structure de sortie des GB et ce, en condition basale. Ces informations ajoutent alors un niveau de complexité supplémentaire aux nombreuses modulations de l'activité neuronale de la SNr et pose la question du rôle de ces cellules en conditions pathologiques ou lors de la SHF du NST.

Discussion générale et perspectives

Dans ce travail, nous avons étudié les interactions bidirectionnelles entre les neurones et les astrocytes de la SNr, en condition physiologique. Grâce aux techniques d'imagerie calcique et d'électrophysiologie, nous avons pu mettre en évidence des régulations bilatérales entre les activités neuronales et astrocytaires au sein de cette structure. Tout d'abord, nos résultats révèlent la présence d'activités calciques spontanées dans les astrocytes de la SNr. Ces activités sont à la fois autonomes et dépendantes de l'activité neuronale. Ainsi, les astrocytes sont sensibles aux libérations toniques de glutamate et de GABA en condition basale ou lors de la SHF du NST. A l'inverse, nous avons montré que les astrocytes régulent l'activité de décharge spontanée des neurones de la SNr. Cette régulation fait intervenir, de manière non exhaustive, **1)** la recapture astrocytaire du glutamate et/ou du GABA extracellulaire et **2)** un mécanisme dépendant du calcium. Bien que préliminaires, nos résultats suggèrent que les activités calciques spontanées pourraient être à l'origine d'une libération d'ATP, responsable d'une diminution de la libération de glutamate au niveau des terminaisons subthalamo-nigrales.

Dans cette partie, nous discuterons plus particulièrement de l'aspect bidirectionnel des interactions neurone-astrocyte au sein de la SNr, des conséquences fonctionnelles de ces interactions et des potentielles implications que ces interactions pourraient avoir en condition pathologique dans la dérégulation de l'activité neuronale de la SNr.

I Aspect bidirectionnel de la communication entre les neurones et les astrocytes de la SNr.

I.1. Les astrocytes de la SNr et la balance glutamate/GABA : spectateurs ou acteurs ?

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les astrocytes de la SNr sont activés de manière tonique par les libérations spontanées de glutamate provenant du NST et de GABA provenant probablement du GPe et des collatérales d'axones de la SNr. En parallèle, nous avons montré que les astrocytes modulent l'action de ces neurotransmetteurs, en contrôlant d'une part, la durée et la puissance d'action du glutamate (et probablement également du GABA) dans la fente synaptique et d'autre part, la fréquence de décharge neuronale *via* une régulation potentielle de la libération de glutamate. Ainsi, les astrocytes seraient non seulement sensibles à la balance glutamate/GABA mais ils seraient également acteurs dans la régulation de cette balance, cruciale dans la transmission des informations au thalamus. Par ailleurs, cela suggère qu'ils pourraient également être impliqués dans la perturbation de cet équilibre, notamment en condition pathologique. Nous discuterons de l'éventuelle implication des astrocytes de la SNr dans certains aspects de la maladie de Parkinson par la suite.

L'induction d'un signal calcique dans les astrocytes de la SNr met en jeu une activation des récepteurs du glutamate et du GABA, exprimés de manière hétérogène par les astrocytes. Nous avons observé que certains astrocytes sont activés uniquement par le glutamate et d'autres uniquement par le GABA alors que certains peuvent être activés par les deux types de neurotransmetteurs. Ces différences d'activation avaient été mises en évidence par Céline Bouyssières (thèse Céline Bouyssières, 2008). Cela suggère que les astrocytes de la SNr pourraient exprimer différents profils de récepteurs. Cette expression différentielle a également été mise en évidence au niveau de l'hippocampe, où les astrocytes sont activés par le glutamate provenant des collatérales de Schaeffer, par l'ACh provenant de l'alveus mais pas par le glutamate provenant également de l'alveus. Cela suggère que les récepteurs du glutamate sont localisés préférentiellement au niveau des terminaisons des collatérales de Schaeffer, ce qui permet de régionaliser les différents types d'informations neuronales (Perea and Araque, 2005). Dans le cas de la SNr, nous pourrions imaginer que les prolongements astrocytaires situés au niveau des terminaisons subthalamo-nigrales expriment

préférentiellement les récepteurs du glutamate alors que les astrocytes dont les prolongements sont majoritairement en contact avec les synapses GABAergiques (striato-nigrales, pallido-nigrales, nigro-nigrales) exprimeraient surtout des récepteurs du GABA. Par ailleurs, ces deux types d'activation (par le GABA ou le glutamate) sont-ils à l'origine d'effets similaires ? En effet, les signaux calciques induits par l'activation de différents types de récepteurs se distinguent par des typologies spatiotemporelles différentes conduisant à l'activation de cibles cellulaires différentes (Verkhratsky and Kettenmann, 1996; Berridge et al., 2003). L'activation des récepteurs du glutamate ou du GABA, voire des différents sous-types de récepteurs pour le glutamate, pourrait donc être à l'origine de l'activation de différentes voies de signalisation et aboutir à des conséquences fonctionnelles distinctes. Si tel est le cas, nous pourrions alors imaginer que les astrocytes de la SNr pourraient être organisés en territoires fonctionnels comme cela a été décrit dans d'autres structures (Fellin, 2009) avec une prise en compte des informations synaptiques et une intégration des ces informations propre à chaque astrocyte, en fonction des synapses recouvertes, de l'environnement synaptique voire des zones anatomiques de la SNr.

Pour aller plus loin, nous pourrions également imaginer que ces territoires pourraient être recrutés de différentes manières en fonction de l'état de fonctionnement du réseau des GB. En effet, il est intéressant de noter que la part de GABA et de glutamate impliquée dans la réponse à la SHF diffère de ce qui est observé en condition basale. Concernant les activités calciques spontanées en absence de stimulation, les récepteurs du glutamate semblent être majoritairement impliqués (le blocage des récepteurs du glutamate diminue la proportion d'astrocytes spontanément actifs d'environ 64% alors que le blocage des récepteurs du GABA entraîne une diminution d'environ 48%). Lorsque le NST est stimulé à haute fréquence, cette tendance s'inverse (le blocage des récepteurs du GABA entraîne une diminution d'activité d'environ 73% et celui des récepteurs du glutamate d'environ 69%). Ces différences sont peut-être le reflet de la modulation de la balance GABA/glutamate imposée par la SHF du NST (Maurice et al., 2003; Windels et al., 2003; Boulet et al., 2006) : de manière spéculative, nous pouvons imaginer qu'en fonction des paramètres de stimulation, celle-ci pourrait moduler différemment les afférences subthalamiques et pallidales et, au final, recruter différents territoires astrocytaires fonctionnels. De plus, si l'activation des astrocytes par le GABA ou le glutamate stimule différentes voies de signalisation et aboutit à la mise en jeu de différentes fonctions cellulaires, alors nous pouvons imaginer que la SHF du NST pourrait adapter les fonctions des astrocytes de la SNr. Cependant, les différences d'activation des récepteurs observées en condition basale ou suite à la SHF du NST pourraient également être le résultat d'effets indirects, passant par l'activation de différents récepteurs neuronaux.

Ainsi, les astrocytes semblent être des « spectateurs » de la balance GABA/glutamate, dans le sens où ils sont affectés par les libérations de ces deux neurotransmetteurs. Cette activation

des astrocytes pourrait se faire de manière plus ou moins exclusive (uniquement par le glutamate, uniquement par le GABA ou par les deux) créant ainsi des territoires fonctionnels astrocytaires au sein de la SNr. Par ailleurs, la SNr est également la cible d'autres neurotransmetteurs et neuromodulateurs, comme la dopamine, l'acétylcholine, la sérotonine, l'histamine ou la glycine (Zhou and Lee, 2011). Il faut donc garder à l'esprit que les astrocytes pourraient également être activés par l'un ou plusieurs de ces acteurs.

A l'inverse, les astrocytes semblent également être des acteurs dans la modulation de cette balance excitation/inhibition grâce, notamment, à leur activité de recapture et *via* un mécanisme dépendant du calcium. Ce mécanisme (que nous aborderons plus en détail dans le paragraphe suivant), tend à diminuer la fréquence de décharge spontanée des neurones nigraux. Lorsque la fréquence de décharge des neurones de la SNr est trop élevée, cela se traduit par une inhibition excessive du thalamus, empêchant la transmission des informations au cortex. Ces informations suggèrent que les astrocytes pourraient être impliqués dans la transmission des informations entre la SNr et ses efférences. Nous avons mis en évidence que le glutamate et probablement le GABA sont recaptés par les transporteurs astrocytaires. Il est intéressant de noter que ces transporteurs pourraient agir en partenariat étroit dans la régulation de l'activité neuronale. En effet, il a été montré au niveau de l'hippocampe chez le rat, que la recapture du glutamate par les astrocytes pouvait être à l'origine d'une libération de GABA par ces mêmes astrocytes, par réversion des transporteurs GATs (Heja et al., 2009; Heja et al., 2012). Un tel phénomène pourrait alors être envisageable dans la SNr et ajouter un niveau de complexité supplémentaire potentiellement dépendant des conditions environnementales et territoriales.

Enfin, nous pouvons nous interroger sur l'impact de la recapture des neurotransmetteurs sur les astrocytes eux-mêmes, puisqu'il a été montré que ce phénomène pouvait s'accompagner d'un signal calcique intracellulaire. C'est notamment le cas au niveau du cortex visuel chez le furet, où la réponse calcique des astrocytes à un stimulus visuel est bloquée par l'inhibition des transporteurs au glutamate (Schummers et al., 2008) ou encore dans le bulbe olfactif chez la souris, où la recapture du GABA induit des libérations de calcium des stocks internes (Doengi et al., 2009). Dès lors, la recapture du glutamate ou du GABA pourrait également déclencher différentes fonctions astrocytaires dépendantes du calcium dont l'implication sera discutée dans le paragraphe suivant.

1.2. Astrocytes et neurones de la SNr : un ménage à trois complexe.

Au-delà de leur activité de recapture, nos résultats montrent que les astrocytes sont capables de réguler l'activité neuronale *via* un mécanisme dépendant du calcium. Certaines données

nous permettent d'imaginer que ce phénomène pourrait notamment consister en une libération d'ATP. Ainsi, au sein des synapses tripartites de la SNr, les astrocytes interviennent donc dans la régulation de l'activité neuronale de différentes façons. Ils permettraient en effet de moduler la balance excitation/inhibition en recaptant le glutamate libéré et probablement le GABA et peut-être aussi de contrôler la libération de glutamate provenant du NST.

Cependant, l'absence d'informations concernant le recouvrement astrocytaire des synapses de la SNr ne nous permet pas de conclure quant à l'action homo ou hétéro-synaptique de l'ATP. En effet, plusieurs scénarii sont envisageables (figure 41). Dans l'hypothèse où seules les synapses glutamatergiques seraient enrobées, l'adénosine pourrait agir de manière homo-synaptique et rétrograde (figure 41A). Cependant, au vu des résultats précédents montrant l'activation des astrocytes par le glutamate et/ou le GABA, il est peu probable que seules les synapses glutamatergiques soient en contact avec un prolongement astrocytaire. Dans l'hypothèse où les deux types de synapses seraient tripartites, l'adénosine pourrait alors également agir de manière hétéro-synaptique comme cela a été décrit au niveau des collatérales de Schaeffer (Pascual et al., 2005; Serrano et al., 2006). Cette situation conduit également à plusieurs niveaux de régulation. Etant donné qu'un même astrocyte peut contacter plusieurs neurones (Halassa et al., 2007b), celui-ci pourrait être activé au niveau de l'un de ses contacts synaptiques et libérer de l'ATP au niveau d'un autre (figure 41B). Enfin, l'astrocyte pourrait être activé et entraîner une libération d'ATP à distance (figure 41C). Ce mécanisme pourrait alors être sous-tendu par la propagation d'un signal calcique *via* les jonctions communicantes de type gap au sein du réseau astrocytaire. Grâce à ce phénomène, des astrocytes distants pourraient être activés et agir en retour sur l'activité neuronale, à différents niveaux de la SNr.

Par ailleurs, les différentes situations décrites ci-dessus ne sont pas exclusives et ces différents mécanismes pourraient être impliqués de manière simultanée.

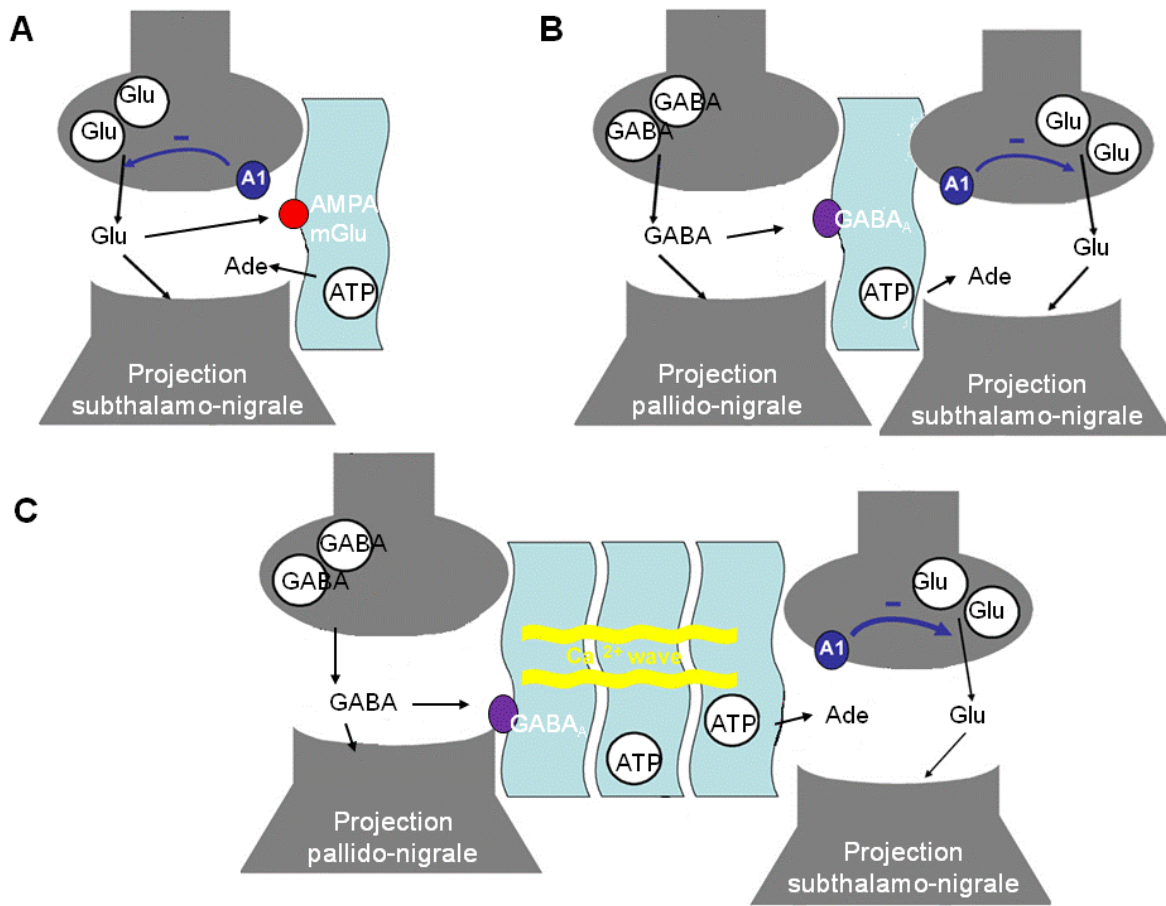


Figure 41: Hypothèses des conséquences d'une gliotransmission d'ATP dans la SNr. A. Hypothèse de l'action homo-synaptique de l'adénosine : l'ATP libéré par les astrocytes est transformé en adénosine qui, via l'activation des récepteurs de type A_1 , agit de manière rétrograde et diminue la libération de glutamate dans la SNr. B. Hypothèse de l'action hétéro-synaptique de l'adénosine au niveau d'un même astrocyte : les contacts avec différents neurones permettent à un même astrocyte d'agir différemment en fonction de la synapse contactée. Cette hypothèse suggère l'existence de micro-domaines fonctionnels au sein d'un même astrocyte. C. Hypothèse de l'action hétéro-synaptique de l'adénosine via la diffusion de vague calcique : l'activation d'un astrocyte entraîne la libération d'ATP par un autre astrocyte du réseau. Glu : glutamate, Ade : adénosine. Modifié d'après Cunha, 2008.

Cependant, de nombreuses questions demeurent, concernant par exemple le type d'activités calciques (autonomes ou évoquées) responsable de la libération d'ATP. D'autre part, nous avons précédemment discuté le fait que, selon le type d'activation (glutamate *versus* GABA), les voies de signalisation mises en jeu pouvaient être différentes. Dès lors, la libération d'ATP peut-elle être provoquée par ces deux types d'activation ? Ces différentes interrogations ouvrent différents champs d'investigations pour la suite.

L'organisation des astrocytes au sein de la SNr est également un point qu'il nous faudra étudier en détail. Des expériences de reconstructions tridimensionnelles de synapses glutamatergiques et GABAergiques suite à des acquisitions en microscopie électronique sont

actuellement en cours et seront très informatives (collaboration avec Karin Pernet-Gallet, Grenoble Institut des Neurosciences). Comme nous l'avons décrit ci-dessus, la définition du type de synapse (symétrique ou asymétrique) contacté par un prolongement astrocytaire nous permettrait de mieux comprendre le mode d'action de l'ATP. Par ailleurs, cela nous permettrait d'établir la proportion de synapses tripartites dans la SNr. En effet, le degré d'enrobage synaptique varie en fonction des structures. Chez le rat, au niveau de l'hippocampe par exemple, environ 57% des synapses sont enrobées (Ventura and Harris, 1999) contre seulement 29% au niveau du cortex visuel (Spacek, 1985). Des différences peuvent également être retrouvées au sein d'une même structure. C'est le cas du cervelet, chez le rat, où environ 67% des synapses sont tripartites au niveau des fibres parallèles contre 94% au niveau des fibres grimpantes (Xu-Friedman et al., 2001). L'enrobage synaptique est un phénomène important car il permet d'augmenter l'efficacité de la transmission synaptique (Witcher et al., 2007). Cette information nous permettrait donc d'évaluer le degré d'implication des astrocytes dans la régulation de l'activité neuronale nigrale. En parallèle, il serait intéressant d'étudier si l'enrobage astrocytaire de la SNr est un phénomène dynamique [comme décrit au niveau de l'hippocampe (Haber et al., 2006a)]. Si tel est le cas, la dynamique du recouvrement pourrait-elle s'adapter aux conditions, comme par exemple, aux modulations de la balance GABA/glutamate ? Enfin, l'organisation des réseaux astrocytaires au sein de la SNr est également une donnée importante. Cette structure est organisée de façon particulière en respectant une géométrie en « pelure d'oignon » autour d'un noyau central (Deniau and Chevalier, 1992; Deniau et al., 1996). Il serait intéressant de savoir si les réseaux astrocytaires respectent également cette organisation. Si tel est le cas, cela indique que les astrocytes appartenant à un même réseau peuvent être activés et réguler certains territoires fonctionnels de la SNr comme cela a été décrit au niveau du cortex somatosensoriel [où les réseaux sont confinés au sein d'un même tonneau (Houades et al., 2008)]. D'un point de vue fonctionnel, cela suggérerait que les astrocytes respectent la somatotopie des afférences et efférences de la SNr. A l'inverse, les réseaux astrocytaires pourraient s'étendre sur différents territoires anatomiques nigraux, à l'image de l'arborisation dendritique décrite dans cette structure (Mailly et al., 2001) et participer alors à une sorte de *continuum* de l'information.

A plusieurs reprises, nous avons évoqué le mode d'action différentiel de l'adénosine sur les récepteurs de type A_1 ou A_{2A} . Dans la partie précédente, nous avons émis l'hypothèse que l'activation des récepteurs de type A_{2A} , s'ils sont présents dans la SNr, pourrait ne pas avoir lieu en conditions basales mais être mise en jeu lors d'activités neuronales plus intenses, comme par exemple durant la SHF du NST. Si tel était le cas, quelles seraient alors les conséquences sur l'activité neuronale de la SNr ? Ici encore, plusieurs hypothèses sont possibles. L'activation des récepteurs de type A_{2A} pourrait en effet augmenter la libération de glutamate ou de GABA, en fonction du type de synapse incriminé. En parallèle, l'activation

des récepteurs de type A_{2A} pourrait s'opposer à celle des récepteurs de type A_1 (Cunha, 2008) et être ainsi, à l'origine d'effets totalement opposés. Les récepteurs de type A_{2A} pourraient également avoir un rôle en condition pathologique et nous discuterons de cette hypothèse par la suite.

Enfin, n'oublions pas que l'excitabilité calcique des astrocytes est à l'origine de différentes fonctions et ne se résume pas seulement à la libération de gliotransmetteurs [qui de plus, reste débattue (Fiacco et al., 2007; Agulhon et al., 2010)]. Ces fonctions sont diverses et comprennent, entre autres, la régulation de la circulation sanguine au niveau local (Zonta et al., 2003), la régulation de la recapture du K^+ (*via* la modulation de l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase) (Wang et al., 2012) ou encore la régulation de l'expression de transporteurs ou récepteurs.

Au sein de la SNr, les astrocytes participent donc de manière active à la régulation de l'activité neuronale. L'ensemble des résultats présentés ici suggère que les astrocytes pourraient intervenir à différents niveaux et de différentes manières. Cette étude, bien que non exhaustive, met en avant une implication de ces cellules dans la physiologie des ganglions de la base, à l'instar de ce qui est déjà connu dans le striatum (Goubard et al., 2011) et ouvre vers différentes perspectives comme la caractérisation de l'enrobage synaptique dans la SNr, l'organisation des réseaux astrocytaires, l'établissement d'un lien direct entre les activités calciques spontanées et la libération d'ATP, ou encore l'étude des interactions neurones-astrocytes dans la SNr en conditions pathologiques.

II Les astrocytes sont-ils impliqués dans la dérégulation de l'activité neuronale de la SNr ?

Cette étude a mis en évidence, pour la première fois, l'implication des astrocytes dans la régulation physiologique de l'activité neuronale de la SNr. Mais qu'en est-il des fonctions de ces cellules en conditions pathologiques et notamment dans la maladie de Parkinson ? Comme nous l'avons précédemment décrit, la MP se caractérise par une perturbation de la balance glutamate/GABA au sein de la SNr en conséquence d'une hyperactivité du NST et aboutit à une hyperactivité de la SNr. Les astrocytes de la SNr étant sensibles à cette balance, cela suggère qu'ils sont probablement concernés par cette perturbation. Une étude concernant les activités calciques spontanées des astrocytes a montré que les astrocytes réactifs perdaient leur capacité à émettre des signaux calciques de façon spontanée (Aguado et al., 2002). Cette information est d'autant plus importante que la MP s'accompagne d'une gliose réactionnelle dans différents noyaux des GB dont la SNr (décrite chez le rat lésé à la 6-OHDA) (Gomide and Chadi, 2005; Henning et al., 2008). Dès lors, il serait intéressant d'étudier le devenir des activités calciques spontanées des astrocytes de la SNr lors de cette pathologie. Cette question commence tout juste à être abordée au laboratoire. En effet, nous avons étudié les activités calciques des astrocytes de la SNr lors d'un blocage de la transmission dopaminergique par application d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques de type D1 et D2 sur tranches. Il avait été préalablement montré que, dans ces conditions, les neurones de la SNr adoptent un mode de décharge en bouffées, caractéristique de la MP (Degos et al., 2005; Ibanez-Sandoval et al., 2007; Aceves et al., 2011). Dans ces conditions de blocage de la transmission dopaminergique, aucune différence significative n'a été observée au niveau de la proportion d'astrocytes actifs au sein de la SNr. Cependant, nous avons relevé une modification, en terme de codage des activités calciques. En effet, nous avons mis en évidence une diminution significative de l'amplitude, de la durée et de la fréquence des signaux calciques astrocytaires. Ce travail, réalisé par Anthony Bosson lors d'un stage de master 1, reste préliminaire mais témoigne de modifications de l'excitabilité astrocytaire induites par le blocage de la transmission dopaminergique, apparenté à l'hypodopaminergie par certains auteurs (Aceves et al., 2011). Les modifications de l'activité calcique des astrocytes seront également étudiées dans un modèle de lésion à la 6-OHDA, permettant de se rapprocher au mieux des conditions pathologiques. En effet, l'application d'antagonistes sur tranche ne reflète pas tous les aspects de la pathologie et notamment les modifications au long cours comme l'astrogliose décrite précédemment ou encore les plasticités se mettant en place dans l'ensemble du réseau des GB.

Il sera également intéressant d'étudier les perturbations de certaines fonctions astrocytaires comme la recapture ou la libération de gliotransmetteurs. Concernant la recapture, des diminutions de l'expression des transporteurs GLAST et GLT-1 ont été mises en évidence au niveau du striatum chez le rat traité à la 6-OHDA (Chung et al., 2008) ou la souris intoxiqué au MPTP (Dervan et al., 2004). Au niveau de la SNr, on sait que les taux de glutamate extracellulaires sont augmentés en raison de l'hyperactivité du NST (Windels et al., 2003) et cela aboutit à une hyperactivité des neurones de la SNr. Il serait donc intéressant d'étudier la recapture du glutamate dans ces conditions. Les transporteurs sont-ils surexprimés afin de limiter l'excitotoxicité ? A l'inverse, l'activité des transporteurs est-elle perturbée, exacerbant ainsi les effets néfastes de l'hyper-glutamatergie ? Si le phénomène de couplage entre la recapture de glutamate et la libération de GABA décrite précédemment existe dans la SNr, ce phénomène est-il également perturbé ? Il est intéressant de noter que la recapture astrocytaire peut être régulée de différentes façons. Il a par exemple été montré que la recapture du glutamate peut être diminuée par l'action de l'adénosine *via* l'activation des récepteurs de type A_{2A} exprimés par les astrocytes (Li et al., 2001; Matos et al., 2012). Dans l'hypothèse où les astrocytes de la SNr exprimeraient ce type de récepteurs, ces informations sont alors d'un intérêt majeur. En effet, rappelons que les récepteurs de l'adénosine de type A_{2A} semblent plutôt être activés par de fortes concentrations d'adénosine, d'origine essentiellement neuronale (Cunha, 2008). Dès lors, les récepteurs de type A_{2A} astrocytaires seraient plutôt activés lors de fortes activités neuronales, transitant par exemple par les neurones du NST lors de la maladie de Parkinson. Dans ces conditions, la diminution du taux de recapture astrocytaire du glutamate induite par l'activation des récepteurs A_{2A} contribuerait à exacerber l'hyperactivité glutamatergique caractéristique de la maladie.

En parallèle, si l'excitabilité calcique des astrocytes de la SNr est modifiée, cela engendrera probablement des perturbations de leurs fonctions et, entre autres, de la gliotransmission. Chez la souris traitée au MPTP, une étude a mis en évidence une augmentation des taux de D-sérine et de sérine racémase dans les astrocytes au niveau de la SNc et du striatum, qui pourrait être à l'origine d'une suractivation des récepteurs NMDA et mener à des phénomènes d'excitotoxicité (Lu et al., 2011). Ces résultats indiquent que l'hypodopaminergie peut être à l'origine de modifications fonctionnelles astrocytaires menant à l'exacerbation de la pathologie justifiant l'intérêt de révéler de telles modifications dans la SNr.

Enfin, il serait intéressant de comparer le degré de recouvrement astrocytaire en condition physiologique et pathologique, afin de déterminer si d'éventuels mécanismes de compensation peuvent avoir lieu, à l'image de ce qui a été décrit dans le striatum (Villalba and Smith, 2011).

Nous avons montré que la SHF du NST augmente la proportion d'astrocytes actifs et nous imaginons qu'elle pourrait ainsi recruter et moduler différents territoires fonctionnels. Dès lors, il serait intéressant d'étudier l'impact de cette stimulation en conditions d'hypodopaminergie. Les effets de la stimulation sur l'activité des astrocytes seraient-ils les mêmes qu'en conditions physiologiques ? Permettraient-ils de restaurer l'activité astrocytaire de la SNr (dans l'hypothèse de modifications liées à la pathologie) ? Et pour aller plus loin, les astrocytes de la SNr pourraient-ils être impliqués dans certains des effets bénéfiques de la stimulation sur l'activité neuronale ?

En conclusion, les différents travaux réalisés durant cette thèse ont permis de mettre en évidence une implication des astrocytes dans la régulation physiologique de l'activité neuronale de la SNr. Nous avons montré que les relations entre ces deux types cellulaires sont bidirectionnelles et ont de fortes conséquences fonctionnelles. Ces résultats ajoutent un niveau de complexité supplémentaire aux différents mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité neuronale de la SNr, structure de sortie des GB, et mettent l'astrocyte dans une position de senseur et de modulateur de cette activité nigrale.

Bibliographie

A

- Aceves JJ, Rueda-Orozco PE, Hernandez-Martinez R, Galarraga E, Bargas J (2011) Bidirectional plasticity in striatonigral synapses: a switch to balance direct and indirect basal ganglia pathways. *Learn Mem* 18:764-773.
- Acosta-Garcia J, Hernandez-Chan N, Paz-Bermudez F, Sierra A, Erlij D, Aceves J, Floran B (2009) D4 and D1 dopamine receptors modulate [3H] GABA release in the substantia nigra pars reticulata of the rat. *Neuropharmacology* 57:725-730.
- Afsharpour S (1985) Topographical projections of the cerebral cortex to the subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* 236:14-28.
- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E (2002) Neuronal activity regulates correlated network properties of spontaneous calcium transients in astrocytes in situ. *J Neurosci* 22:9430-9444.
- Agulhon C, Fiacco TA, McCarthy KD (2010) Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. *Science* 327:1250-1254.
- Agulhon C, Petravic J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiacco TA, McCarthy KD (2008) What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59:932-946.
- Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF (2008) Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem Rev* 108:1687-1707.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-271.
- Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP (2003) The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 4:991-1001.
- Ammari R, Lopez C, Bioulac B, Garcia L, Hammond C (2010) Subthalamic nucleus evokes similar long lasting glutamatergic excitations in pallidal, entopeduncular and nigral neurons in the basal ganglia slice. *Neuroscience* 166:808-818.
- Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1-14.
- Andrade P, Noblesse LH, Temel Y, Ackermans L, Lim LW, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V (2010) Neurostimulatory and ablative treatment options in major depressive disorder: a systematic review. *Acta Neurochir (Wien)* 152:565-577.
- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24:6920-6927.
- Angulo MC, Le Meur K, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2008) GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog Neurobiol* 86:297-303.
- Appaix F, Girod S, Boisseau S, Romer J, Vial JC, Albrieux M, Maurin M, Depaulis A, Guillemain I, van der Sanden B (2012) Specific in vivo staining of astrocytes in the whole brain after intravenous injection of sulforhodamine dyes. *PLoS One* 7:e35169.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20:666-673.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JJ, Buno W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443-2450.
- Arnth-Jensen N, Jabaudon D, Scanziani M (2002) Cooperation between independent hippocampal synapses is controlled by glutamate uptake. *Nat Neurosci* 5:325-331.

- Atherton JF, Bevan MD (2005) Ionic mechanisms underlying autonomous action potential generation in the somata and dendrites of GABAergic substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *J Neurosci* 25:8272-8281.
- Avila I, Parr-Brownlie LC, Brazhnik E, Castaneda E, Bergstrom DA, Walters JR (2009) Beta frequency synchronization in basal ganglia output during rest and walk in a hemiparkinsonian rat. *Exp Neurol* 221:307-319.
- Aziz TZ, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR (1991) Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Mov Disord* 6:288-292.

B

- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98:641-653.
- Bar-Gad I, Heimer G, Ritov Y, Bergman H (2003) Functional correlations between neighboring neurons in the primate globus pallidus are weak or nonexistent. *J Neurosci* 23:4012-4016.
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152.
- Barres BA (1991) Glial ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 1:354-359.
- Barres BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60:430-440.
- Bay V, Butt AM (2012) Relationship between glial potassium regulation and axon excitability: a role for glial Kir4.1 channels. *Glia* 60:651-660.
- Beckstead RM, Frankfurter A (1982) The distribution and some morphological features of substantia nigra neurons that project to the thalamus, superior colliculus and pedunculopontine nucleus in the monkey. *Neuroscience* 7:2377-2388.
- Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J (1987) Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol* 50:344-346.
- Benazzouz A, Piallat B, Pollak P, Benabid AL (1995) Responses of substantia nigra pars reticulata and globus pallidus complex to high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats: electrophysiological data. *Neurosci Lett* 189:77-80.
- Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci* 5:382-389.
- Benazzouz A, Gao DM, Ni ZG, Piallat B, Bouali-Benazzouz R, Benabid AL (2000) Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on the neuronal activities of the substantia nigra pars reticulata and ventrolateral nucleus of the thalamus in the rat. *Neuroscience* 99:289-295.
- Benedetti B, Matyash V, Kettenmann H (2011) Astrocytes control GABAergic inhibition of neurons in the mouse barrel cortex. *J Physiol* 589:1159-1172.
- Benfenati V, Ferroni S (2009) Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* 168:926-940.
- Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE (2000) Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405:187-191.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436-1438.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72:507-520.
- Berridge MJ (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 200:315-319.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.
- Beurrier C, Bioulac B, Hammond C (2000) Slowly inactivating sodium current (I(NaP)) underlies single-spike activity in rat subthalamic neurons. *J Neurophysiol* 83:1951-1957.

- Beurrier C, Ben-Ari Y, Hammond C (2006) Preservation of the direct and indirect pathways in an in vitro preparation of the mouse basal ganglia. *Neuroscience* 140:77-86.
- Beurrier C, Congar P, Bioulac B, Hammond C (1999) Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode. *J Neurosci* 19:599-609.
- Beurrier C, Bioulac B, Audin J, Hammond C (2001) High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. *J Neurophysiol* 85:1351-1356.
- Bevan MD, Wilson CJ (1999) Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *J Neurosci* 19:7617-7628.
- Bevan MD, Wilson CJ, Bolam JP, Magill PJ (2000) Equilibrium potential of GABA(A) current and implications for rebound burst firing in rat subthalamic neurons in vitro. *J Neurophysiol* 83:3169-3172.
- Bevan MD, Magill PJ, Terman D, Bolam JP, Wilson CJ (2002a) Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci* 25:525-531.
- Bevan MD, Magill PJ, Hallworth NE, Bolam JP, Wilson CJ (2002b) Regulation of the timing and pattern of action potential generation in rat subthalamic neurons in vitro by GABA-A IPSPs. *J Neurophysiol* 87:1348-1362.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7:613-620.
- Bianchi L, Colivicchi MA, Bolam JP, Della Corte L (1998) The release of amino acids from rat neostriatum and substantia nigra in vivo: a dual microdialysis probe analysis. *Neuroscience* 87:171-180.
- Birdsall NJ, Hulme EC (1976) Biochemical studies on muscarinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 27:7-16.
- Bogenpohl JW, Ritter SL, Hall RA, Smith Y (2011) Adenosine A2A receptor in the monkey basal ganglia: Ultrastructural localization and colocalization with the metabotropic glutamate receptor 5 in the striatum. *J Comp Neurol* 520:570-589.
- Boison D, Chen JF, Fredholm BB (2010) Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ* 17:1071-1082.
- Bonaccorso C, Micale N, Ettari R, Grasso S, Zappala M (2011) Glutamate binding-site ligands of NMDA receptors. *Curr Med Chem* 18:5483-5506.
- Bonansco C, Couve A, Perea G, Ferradas CA, Roncagliolo M, Fuenzalida M (2011) Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* 33:1483-1492.
- Borden LA (1996) GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Int* 29:335-356.
- Bordey A, Sontheimer H (2000) Ion channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions. *Glia* 30:27-38.
- Bosch C, Degos B, Deniau JM, Venance L (2011) Subthalamic nucleus high-frequency stimulation generates a concomitant synaptic excitation-inhibition in substantia nigra pars reticulata. *J Physiol* 589:4189-4207.
- Boulet S, Lacombe E, Carcenac C, Feuerstein C, Sgambato-Faure V, Poupard A, Savasta M (2006) Subthalamic stimulation-induced forelimb dyskinesias are linked to an increase in glutamate levels in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 26:10768-10776.
- Bouyssières C (2010) Induction de signaux calciques dans les cellules gliales de la substance noire réticulée par la stimulation électrique du noyau sous-thalamique. Thèse de l'Université Joseph Fourier, Grenoble Spécialité : Neurosciences:176.
- Boyes J, Bolam JP (2003) The subcellular localization of GABA(B) receptor subunits in the rat substantia nigra. *Eur J Neurosci* 18:3279-3293.
- Bradl M, Lassmann H (2009) Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:37-53.
- Bradley SR, Marino MJ, Wittmann M, Rouse ST, Awad H, Levey AI, Conn PJ (2000) Activation of group II metabotropic glutamate receptors inhibits synaptic excitation of the substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 20:3085-3094.

- Brown LL, Markman MH, Wolfson LI, Dvorkin B, Warner C, Katzman R (1979) A direct role of dopamine in the rat subthalamic nucleus and an adjacent intrapeduncular area. *Science* 206:1416-1418.
- Brown P (2003) Oscillatory nature of human basal ganglia activity: relationship to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Mov Disord* 18:357-363.
- Brown P, Oliviero A, Mazzone P, Insola A, Tonali P, Di Lazzaro V (2001a) Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:1033-1038.
- Brown RE, Stevens DR, Haas HL (2001b) The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* 63:637-672.
- Brown RG, Pluck G (2000) Negative symptoms: the 'pathology' of motivation and goal-directed behaviour. *Trends Neurosci* 23:412-417.
- Burbaud P, Gross C, Benazzouz A, Coussemaque M, Bioulac B (1995) Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons. *Exp Brain Res* 105:48-58.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.
- Butt AM (2006) Neurotransmitter-mediated calcium signalling in oligodendrocyte physiology and pathology. *Glia* 54:666-675.

C

- Calabresi P, Misgeld U, Dodt HU (1987) Intrinsic membrane properties of neostriatal neurons can account for their low level of spontaneous activity. *Neuroscience* 20:293-303.
- Carmignoto G (2000) Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Prog Neurobiol* 62:561-581.
- Carpenter MB, Nakano K, Kim R (1976) Nigrothalamic projections in the monkey demonstrated by autoradiographic techniques. *J Comp Neurol* 165:401-415.
- Carter AG, Regehr WG (2000) Prolonged synaptic currents and glutamate spillover at the parallel fiber to stellate cell synapse. *J Neurosci* 20:4423-4434.
- Cebrian C, Parent A, Prensa L (2007) The somatodendritic domain of substantia nigra pars reticulata projection neurons in the rat. *Neurosci Res* 57:50-60.
- Chadi G, Gomide VC (2004) FGF-2 and S100beta immunoreactivities increase in reactive astrocytes, but not in microglia, in ascending dopamine pathways following a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. *Cell Biol Int* 28:849-861.
- Chakravarthy VS, Joseph D, Bapi RS (2010) What do the basal ganglia do? A modeling perspective. *Biol Cybern* 103:237-253.
- Chan PK, Chan SC, Yung WH (1998) Presynaptic inhibition of GABAergic inputs to rat substantia nigra pars reticulata neurones by a cannabinoid agonist. *Neuroreport* 9:671-675.
- Chan V, Starr PA, Turner RS (2011) Bursts and oscillations as independent properties of neural activity in the parkinsonian globus pallidus internus. *Neurobiol Dis* 41:2-10.
- Chatha BT, Bernard V, Streit P, Bolam JP (2000) Synaptic localization of ionotropic glutamate receptors in the rat substantia nigra. *Neuroscience* 101:1037-1051.
- Cheramy A, Leviel V, Glowinski J (1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289:537-542.
- Chevalleyre V, Takahashi KA, Castillo PE (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 29:37-76.
- Chiu CS, Brickley S, Jensen K, Southwell A, McKinney S, Cull-Candy S, Mody I, Lester HA (2005) GABA transporter deficiency causes tremor, ataxia, nervousness, and increased GABA-induced tonic conductance in cerebellum. *J Neurosci* 25:3234-3245.
- Chu HY, Zhen X (2010) Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the regulation of midbrain dopamine systems. *Acta Pharmacol Sin* 31:1036-1043.
- Chuhma N, Tanaka KF, Hen R, Rayport S (2011) Functional connectome of the striatal medium spiny neuron. *J Neurosci* 31:1183-1192.

- Chung EK, Chen LW, Chan YS, Yung KK (2008) Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Comp Neurol* 511:421-437.
- Chvatal A, Anderova M, Neprasova H, Prajerova I, Benesova J, Butenko O, Verkhatsky A (2008) Pathological potential of astroglia. *Physiol Res* 57 Suppl 3:S101-110.
- Collingridge GL, Davies J (1981) The influence of striatal stimulation and putative neurotransmitters on identified neurones in the rat substantia nigra. *Brain Res* 212:345-359.
- Connelly WM, Schulz JM, Lees G, Reynolds JN (2010) Differential short-term plasticity at convergent inhibitory synapses to the substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 30:14854-14861.
- Cornea-Hebert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L (1999) Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol* 409:187-209.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.
- Cortes H, Paz F, Erlij D, Aceves J, Floran B (2010) GABA(B) receptors modulate depolarization-stimulated [(3)H]glutamate release in slices of the pars reticulata of the rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol* 649:161-167.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) L-dopa in parkinson's syndrome. *N Engl J Med* 281:272.
- Crill WE (1996) Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu Rev Physiol* 58:349-362.
- Cunha RA (2008) Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochem Int* 52:65-72.

D

- D'Ambrosio R, Wenzel J, Schwartzkroin PA, McKhann GM, 2nd, Janigro D (1998) Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 18:4425-4438.
- Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398-399.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI (1992) An [Na⁺ + K⁺]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51:295-310.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- Dave V, Kimelberg HK (1994) Na(+)-dependent, fluoxetine-sensitive serotonin uptake by astrocytes tissue-printed from rat cerebral cortex. *J Neurosci* 14:4972-4986.
- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R (2000) NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 61:471-479.
- Degos B, Deniau JM, Thierry AM, Glowinski J, Pezard L, Maurice N (2005) Neuroleptic-induced catalepsy: electrophysiological mechanisms of functional recovery induced by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25:7687-7696.
- Dejean C, Gross CE, Bioulac B, Boraud T (2008) Dynamic changes in the cortex-basal ganglia network after dopamine depletion in the rat. *J Neurophysiol* 100:385-396.
- DeLong MR (1971) Activity of pallidal neurons during movement. *J Neurophysiol* 34:414-427.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-285.
- Deniau JM, Chevalier G (1992) The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: distribution of projection neurons. *Neuroscience* 46:361-377.
- Deniau JM, Menetrey A, Charpier S (1996) The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. *Neuroscience* 73:761-781.

- Deniau JM, Kitai ST, Donoghue JP, Grofova I (1982) Neuronal interactions in the substantia nigra pars reticulata through axon collaterals of the projection neurons. An electrophysiological and morphological study. *Exp Brain Res* 47:105-113.
- Deniau JM, Mailly P, Maurice N, Charpier S (2007) The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Prog Brain Res* 160:151-172.
- Deniau JM, Degos B, Bosch C, Maurice N (2010) Deep brain stimulation mechanisms: beyond the concept of local functional inhibition. *Eur J Neurosci* 32:1080-1091.
- Dervan AG, Meshul CK, Beales M, McBean GJ, Moore C, Totterdell S, Snyder AK, Meredith GE (2004) Astroglial plasticity and glutamate function in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 190:145-156.
- Desban M, Kemel ML, Glowinski J, Gauchy C (1993) Spatial organization of patch and matrix compartments in the rat striatum. *Neuroscience* 57:661-671.
- Deschenes M, Bourassa J, Parent A (1995) Two different types of thalamic fibers innervate the rat striatum. *Brain Res* 701:288-292.
- Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, Bhaukaurally K, Santello M, Bouvier D, Tiret P, Volterra A (2011) Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat Neurosci* 14:1276-1284.
- Di Chiara G, Porceddu ML, Morelli M, Mulas ML, Gessa GL (1979) Evidence for a GABAergic projection from the substantia nigra to the ventromedial thalamus and to the superior colliculus of the rat. *Brain Res* 176:273-284.
- Ding S, Wei W, Zhou FM (2010) Molecular and functional differences in voltage-activated sodium currents between GABA projection neurons and dopamine neurons in the substantia nigra. *J Neurophysiol* 106:3019-3034.
- Ding S, Matta SG, Zhou FM (2011) Kv3-like potassium channels are required for sustained high-frequency firing in basal ganglia output neurons. *J Neurophysiol* 105:554-570.
- Doengi M, Hirnet D, Coulon P, Pape HC, Deitmer JW, Lohr C (2009) GABA uptake-dependent Ca(2+) signaling in developing olfactory bulb astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17570-17575.
- Donato R (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1450:191-231.
- Dopico JG, Gonzalez-Hernandez T, Perez IM, Garcia IG, Abril AM, Inchausti JO, Rodriguez Diaz M (2006) Glycine release in the substantia nigra: Interaction with glutamate and GABA. *Neuropharmacology* 50:548-557.
- Dray A, Gonye TJ, Oakley NR (1976) Caudate stimulation and substantia nigra activity in the rat. *J Physiol* 259:825-849.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.

E F

- Elias S, Joshua M, Goldberg JA, Heimer G, Arkadir D, Morris G, Bergman H (2007) Statistical properties of pauses of the high-frequency discharge neurons in the external segment of the globus pallidus. *J Neurosci* 27:2525-2538.
- Emery B (2010) Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330:779-782.
- Enkvist MO, McCarthy KD (1994) Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentration. *J Neurochem* 62:489-495.
- Eulenburg V, Gomez J (2010) Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Res Rev* 63:103-112.
- Fabbrini G, Brochie JM, Grandas F, Nomoto M, Goetz CG (2007) Levodopa-induced dyskinesias. *Mov Disord* 22:1379-1389; quiz 1523.
- Fallon JHL, S.E (1995) *The Rat Nervous System*, second Edition.
- Farber K, Kettenmann H (2006) Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia* 54:656-665.
- Faull RL, Carman JB (1968) Ascending projections of the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 132:73-92.

- Fellin T (2009) Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J Neurochem* 108:533-544.
- Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G (2006) Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J Biol Chem* 281:4274-4284.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729-743.
- Fernandez-Ruiz J, Lastres-Becker I, Cabranes A, Gonzalez S, Ramos JA (2002) Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:257-267.
- Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 20:482-487.
- Ferre S, Ciruela F, Quiroz C, Lujan R, Popoli P, Cunha RA, Agnati LF, Fuxe K, Woods AS, Lluís C, Franco R (2007) Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *ScientificWorldJournal* 7:74-85.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:722-732.
- Fiacco TA, Agulhon C, McCarthy KD (2009) Sorting out astrocyte physiology from pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:151-174.
- Fiacco TA, Agulhon C, Taves SR, Petravic J, Casper KB, Dong X, Chen J, McCarthy KD (2007) Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. *Neuron* 54:611-626.
- Fields RD, Burnstock G (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7:423-436.
- Filali M, Hutchison WD, Palter VN, Lozano AM, Dostrovsky JO (2004) Stimulation-induced inhibition of neuronal firing in human subthalamic nucleus. *Exp Brain Res* 156:274-281.
- Fisher R et al. (2010) Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsia* 51:899-908.
- Floran B, Silva I, Nava C, Aceves J (1988) Presynaptic modulation of the release of GABA by GABAA receptors in pars compacta and by GABAB receptors in pars reticulata of the rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol* 150:277-286.
- Floran B, Aceves J, Sierra A, Martinez-Fong D (1990) Activation of D1 dopamine receptors stimulates the release of GABA in the basal ganglia of the rat. *Neurosci Lett* 116:136-140.
- Floran B, Barajas C, Floran L, Erlij D, Aceves J (2002) Adenosine A1 receptors control dopamine D1-dependent [(3)H]GABA release in slices of substantia nigra pars reticulata and motor behavior in the rat. *Neuroscience* 115:743-751.
- Fornai F, di Poggio AB, Pellegrini A, Ruggieri S, Paparelli A (2007) Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics. *Curr Med Chem* 14:2330-2334.
- Francois C, Tande D, Yelnik J, Hirsch EC (2002) Distribution and morphology of nigral axons projecting to the thalamus in primates. *J Comp Neurol* 447:249-260.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017-1066.
- Fujimura K, Matsuda Y (1989) Autogenous oscillatory potentials in neurons of the guinea pig substantia nigra pars compacta in vitro. *Neurosci Lett* 104:53-57.

G

- Gadea A, Lopez-Colome AM (2001a) Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *J Neurosci Res* 63:453-460.
- Gadea A, Lopez-Colome AM (2001b) Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA: II. GABA transporters. *J Neurosci Res* 63:461-468.
- Galati S, Mazzone P, Fedele E, Pisani A, Peppe A, Pierantozzi M, Brusa L, Tropepi D, Moschella V, Raiteri M, Stanzione P, Bernardi G, Stefani A (2006) Biochemical and electrophysiological changes of substantia nigra pars reticulata driven by subthalamic stimulation in patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 23:2923-2928.

- Gallo V, Mangin JM, Kukley M, Dietrich D (2008) Synapses on NG2-expressing progenitors in the brain: multiple functions? *J Physiol* 586:3767-3781.
- Garcia L, Audin J, D'Alessandro G, Bioulac B, Hammond C (2003) Dual effect of high-frequency stimulation on subthalamic neuron activity. *J Neurosci* 23:8743-8751.
- Garcia L, D'Alessandro G, Fernagut PO, Bioulac B, Hammond C (2005) Impact of high-frequency stimulation parameters on the pattern of discharge of subthalamic neurons. *J Neurophysiol* 94:3662-3669.
- Garcia M, Floran B, Arias-Montano JA, Young JM, Aceves J (1997) Histamine H3 receptor activation selectively inhibits dopamine D1 receptor-dependent [3H]GABA release from depolarization-stimulated slices of rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 80:241-249.
- Gardian G, Vecsei L (2010) Medical treatment of Parkinson's disease: today and the future. *Int J Clin Pharmacol Ther* 48:633-642.
- Gatev P, Darbin O, Wichmann T (2006) Oscillations in the basal ganglia under normal conditions and in movement disorders. *Mov Disord* 21:1566-1577.
- Genoud C, Quairiaux C, Steiner P, Hirling H, Welker E, Knott GW (2006) Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS Biol* 4:e343.
- Gerfen CR (1985) The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 236:454-476.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Giaume C, McCarthy KD (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19:319-325.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010) Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87-99.
- Gomide V, Chadi G (2005) Glial bFGF and S100 immunoreactivities increase in ascending dopamine pathways following striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system: a stereological analysis. *Int J Neurosci* 115:537-555.
- Gonzalez-Hernandez T, Rodriguez M (2000) Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol* 421:107-135.
- Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, Bains JS (2005) Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci* 8:1078-1086.
- Gotz T, Kraushaar U, Geiger J, Lubke J, Berger T, Jonas P (1997) Functional properties of AMPA and NMDA receptors expressed in identified types of basal ganglia neurons. *J Neurosci* 17:204-215.
- Goubard V, Fino E, Venance L (2011) Contribution of astrocytic glutamate and GABA uptake to corticostriatal information processing. *J Physiol* 589:2301-2319.
- Grace AA (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41:1-24.
- Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 324:354-359.
- Graeber MB (2010) Changing face of microglia. *Science* 330:783-788.
- Graeber MB, Streit WJ (2009) Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:89-105.
- Graybiel AM, Ragsdale CW, Jr. (1978) Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5723-5726.
- Greenwood K, Butt AM (2003) Evidence that perinatal and adult NG2-glia are not conventional oligodendrocyte progenitors and do not depend on axons for their survival. *Mol Cell Neurosci* 23:544-558.
- Grofova I, Zhou M (1998) Nigral innervation of cholinergic and glutamatergic cells in the rat mesopontine tegmentum: light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol* 395:359-379.

- Gu XL, Long CX, Sun L, Xie C, Lin X, Cai H (2011) Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol Brain* 3:12.
- Guatteo E, Cucchiaroni ML, Mercuri NB (2009) Substantia nigra control of basal ganglia nuclei. *J Neural Transm Suppl* 73:91-101.
- Guridi J, Herrero MT, Luquin R, Guillen J, Obeso JA (1994) Subthalamotomy improves MPTP-induced parkinsonism in monkeys. *Stereotact Funct Neurosurg* 62:98-102.

H

- Haas B, Schipke CG, Peters O, Sohl G, Willecke K, Kettenmann H (2006) Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from astrocytic calcium waves. *Cereb Cortex* 16:237-246.
- Haber M, Zhou L, Murai KK (2006a) Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 26:8881-8891.
- Haber SN (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanat* 26:317-330.
- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* 20:2369-2382.
- Haber SN, Kim KS, Mailly P, Calzavara R (2006b) Reward-related cortical inputs define a large striatal region in primates that interface with associative cortical connections, providing a substrate for incentive-based learning. *J Neurosci* 26:8368-8376.
- Halassa MM, Haydon PG (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* 72:335-355.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007a) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13:54-63.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2009) Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology* 57:343-346.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG (2007b) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* 27:6473-6477.
- Hallworth NE, Wilson CJ, Bevan MD (2003) Apamin-sensitive small conductance calcium-activated potassium channels, through their selective coupling to voltage-gated calcium channels, are critical determinants of the precision, pace, and pattern of action potential generation in rat subthalamic nucleus neurons in vitro. *J Neurosci* 23:7525-7542.
- Hamani C, Saint-Cyr JA, Fraser J, Kaplitt M, Lozano AM (2004) The subthalamic nucleus in the context of movement disorders. *Brain* 127:4-20.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hamilton N, Hubbard PS, Butt AM (2009) Effects of glutamate receptor activation on NG2-glia in the rat optic nerve. *J Anat* 214:208-218.
- Hamilton NB, Attwell D (2010) Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* 11:227-238.
- Hammond C, Yelnik J (1983) Intracellular labelling of rat subthalamic neurones with horseradish peroxidase: computer analysis of dendrites and characterization of axon arborization. *Neuroscience* 8:781-790.
- Hammond C, Bergman H, Brown P (2007) Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci* 30:357-364.
- Harris AL (2007) Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol* 94:120-143.
- Harris NC, Webb C, Greenfield SA (1989) A possible pacemaker mechanism in pars compacta neurons of the guinea-pig substantia nigra revealed by various ion channel blocking agents. *Neuroscience* 31:355-362.
- Hashimoto T, Elder CM, Okun MS, Patrick SK, Vitek JL (2003) Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. *J Neurosci* 23:1916-1923.

- Hassani OK, Mouroux M, Feger J (1996) Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience* 72:105-115.
- Hassinger TD, Guthrie PB, Atkinson PB, Bennett MV, Kater SB (1996) An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13268-13273.
- Heimer LZ, D.S. Alheid, G.F (1995) *The Rat Nervous System*, second Edition.
- Heja L, Nyitrai G, Kekesi O, Dobolyi A, Szabo P, Fiath R, Ulbert I, Pal-Szenthe B, Palkovits M, Kardos J (2012) Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. *BMC Biol* 10:26.
- Heja L, Barabas P, Nyitrai G, Kekesi KA, Lasztoczi B, Toke O, Tarkanyi G, Madsen K, Schousboe A, Dobolyi A, Palkovits M, Kardos J (2009) Glutamate uptake triggers transporter-mediated GABA release from astrocytes. *PLoS One* 4:e7153.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463:232-236.
- Henning J, Strauss U, Wree A, Gimsa J, Rolfs A, Benecke R, Gimsa U (2008) Differential astroglial activation in 6-hydroxydopamine models of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 62:246-253.
- Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR, Richfield EK (1991) Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 547:267-274.
- Hess A, Young JZ (1949) Nodes of Ranvier in the central nervous system. *J Physiol* 108:Proc , 52.
- Hewett JA (2009) Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J Neurochem* 110:1717-1736.
- Hikosaka O (2007) GABAergic output of the basal ganglia. *Prog Brain Res* 160:209-226.
- Hikosaka O, Takikawa Y, Kawagoe R (2000) Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol Rev* 80:953-978.
- Hirase H, Qian L, Bartho P, Buzsaki G (2004) Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol* 2:E96.
- Hirrlinger J, Hulsmann S, Kirchhoff F (2004) Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur J Neurosci* 20:2235-2239.
- Hirsch EC, Hunot S, Hartmann A (2005) Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11 Suppl 1:S9-S15.
- Hirst WD, Price GW, Rattray M, Wilkin GP (1998) Serotonin transporters in adult rat brain astrocytes revealed by [3H]5-HT uptake into glial plasmalemmal vesicles. *Neurochem Int* 33:11-22.
- Hoogland TM, Kuhn B, Gobel W, Huang W, Nakai J, Helmchen F, Flint J, Wang SS (2009) Radially expanding transglial calcium waves in the intact cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3496-3501.
- Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C (2008) Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 28:5207-5217.
- Huang YH, Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 14:346-352.
- Huot P, Fox SH, Brochie JM (2011) The serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 95:163-212.
- Hyland BI, Reynolds JN, Hay J, Perk CG, Miller R (2002) Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience* 114:475-492.

I J

- Ibanez-Sandoval O, Carrillo-Reid L, Galarraga E, Tapia D, Mendoza E, Gomora JC, Aceves J, Bargas J (2007) Bursting in substantia nigra pars reticulata neurons in vitro: possible relevance for Parkinson disease. *J Neurophysiol* 98:2311-2323.
- Ibanez-Sandoval O, Hernandez A, Floran B, Galarraga E, Tapia D, Valdiosera R, Erlij D, Aceves J, Bargas J (2006) Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 95:1800-1811.

- Ikeda H, Kotani A, Koshikawa N, Cools AR (2010) Differential role of GABAA and GABAB receptors in two distinct output stations of the rat striatum: studies on the substantia nigra pars reticulata and the globus pallidus. *Neuroscience* 167:31-39.
- Inazu M, Takeda H, Matsumiya T (2005) Molecular and functional characterization of an Na⁺-independent choline transporter in rat astrocytes. *J Neurochem* 94:1427-1437.
- Inazu M, Kubota N, Takeda H, Zhang J, Kiuchi Y, Oguchi K, Matsumiya T (1999) Pharmacological characterization of dopamine transport in cultured rat astrocytes. *Life Sci* 64:2239-2245.
- Invernizzi RW, Pierucci M, Calcagno E, Di Giovanni G, Di Matteo V, Benigno A, Esposito E (2007) Selective activation of 5-HT(2C) receptors stimulates GABA-ergic function in the rat substantia nigra pars reticulata: a combined in vivo electrophysiological and neurochemical study. *Neuroscience* 144:1523-1535.
- Izzo PN, Graybiel AM, Bolam JP (1987) Characterization of substance P- and [Met]enkephalin-immunoreactive neurons in the caudate nucleus of cat and ferret by a single section Golgi procedure. *Neuroscience* 20:577-587.
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165-229.
- Jaeger D, Kita H (2011) Functional connectivity and integrative properties of globus pallidus neurons. *Neuroscience* 198:44-53.
- Jensen K, Chiu CS, Sokolova I, Lester HA, Mody I (2003) GABA transporter-1 (GAT1)-deficient mice: differential tonic activation of GABAA versus GABAB receptors in the hippocampus. *J Neurophysiol* 90:2690-2701.
- Johnson KA, Niswender CM, Conn PJ, Xiang Z (2011) Activation of group II metabotropic glutamate receptors induces long-term depression of excitatory synaptic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neurosci Lett* 504:102-106.
- Jones TA, Hawrylak N, Greenough WT (1996) Rapid laminar-dependent changes in GFAP immunoreactive astrocytes in the visual cortex of rats reared in a complex environment. *Psychoneuroendocrinology* 21:189-201.
- Juraska JM, Wilson CJ, Groves PM (1977) The substantia nigra of the rat: a Golgi study. *J Comp Neurol* 172:585-600.

K

- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-692.
- Karakaya S, Kipp M, Beyer C (2007) Oestrogen regulates the expression and function of dopamine transporters in astrocytes of the nigrostriatal system. *J Neuroendocrinol* 19:682-690.
- Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13:4908-4923.
- Kawamura M, Jr., Kawamura M (2011) Long-term facilitation of spontaneous calcium oscillations in astrocytes with endogenous adenosine in hippocampal slice cultures. *Cell Calcium* 49:249-258.
- Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, Trosko JE, Sugihara K, Kotake Y, Ohta S (2009) Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 160:61-68.
- Kettenmann H, Schachner M (1985) Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *J Neurosci* 5:3295-3301.
- Kettenmann H, Verkhratsky A (2008) Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* 31:653-659.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Kettunen P, Demas J, Lohmann C, Kasthuri N, Gong Y, Wong RO, Gan WB (2002) Imaging calcium dynamics in the nervous system by means of ballistic delivery of indicators. *J Neurosci Methods* 119:37-43.
- Kimelberg HK (2004) The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int* 45:191-202.
- Kimelberg HK, Macvicar BA, Sontheimer H (2006) Anion channels in astrocytes: biophysics, pharmacology, and function. *Glia* 54:747-757.

- Kirmse K, Dvorzhak A, Kirischuk S, Grantyn R (2008) GABA transporter 1 tunes GABAergic synaptic transmission at output neurons of the mouse neostriatum. *J Physiol* 586:5665-5678.
- Kita H, Kitai ST (1987) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol* 260:435-452.
- Kita H, Tachibana Y, Nambu A, Chiken S (2005) Balance of monosynaptic excitatory and disynaptic inhibitory responses of the globus pallidus induced after stimulation of the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurosci* 25:8611-8619.
- Kitai ST, Deniau JM (1981) Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis. *Brain Res* 214:411-415.
- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP (2001) Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 21:1452-1463.
- Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045-1056.
- Kolomiets BP, Deniau JM, Glowinski J, Thierry AM (2003) Basal ganglia and processing of cortical information: functional interactions between trans-striatal and trans-subthalamic circuits in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 117:931-938.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52-58.
- Koulakoff A, Ezan P, Giaume C (2008) Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56:1299-1311.
- Krack P, Limousin P, Benabid AL, Pollak P (1997) Chronic stimulation of subthalamic nucleus improves levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Lancet* 350:1676.
- Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C, Koudsie A, Limousin PD, Benazzouz A, LeBas JF, Benabid AL, Pollak P (2003) Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 349:1925-1934.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466:622-626.
- Kringelbach ML, Jenkinson N, Owen SL, Aziz TZ (2007) Translational principles of deep brain stimulation. *Nat Rev Neurosci* 8:623-635.
- Kubota Y, Kawaguchi Y (1993) Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. *J Comp Neurol* 332:499-513.
- Kuga N, Sasaki T, Takahara Y, Matsuki N, Ikegaya Y (2011) Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks in vivo. *J Neurosci* 31:2607-2614.
- Kumar KR, Djarmati-Westenberger A, Grunewald A (2011) Genetics of Parkinson's disease. *Semin Neurol* 31:433-440.

L

- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 26:2673-2683.
- Langer LF, Jimenez-Castellanos J, Graybiel AM (1991) The substantia nigra and its relations with the striatum in the monkey. *Prog Brain Res* 87:81-99.
- Lee CR, Tepper JM (2007) A calcium-activated nonselective cation conductance underlies the plateau potential in rat substantia nigra GABAergic neurons. *J Neurosci* 27:6531-6541.
- Lee CR, Tepper JM (2009) Basal ganglia control of substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neural Transm Suppl* 73:71-90.
- Lee KH, Roberts DW, Kim U (2003) Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on subthalamic neurons: an intracellular study. *Stereotact Funct Neurosurg* 80:32-36.
- Lee KH, Chang SY, Roberts DW, Kim U (2004) Neurotransmitter release from high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosurg* 101:511-517.
- Lee S, Yoon BE, Berglund K, Oh SJ, Park H, Shin HS, Augustine GJ, Lee CJ (2010) Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science* 330:790-796.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58:760-793.

- Levy R, Deer TR, Henderson J (2010) Intracranial neurostimulation for pain control: a review. *Pain Physician* 13:157-165.
- Li XX, Nomura T, Aihara H, Nishizaki T (2001) Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors. *Life Sci* 68:1343-1350.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL (1995a) Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. *Mov Disord* 10:672-674.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL (1995b) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345:91-95.
- Lin SC, Bergles DE (2004) Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat Neurosci* 7:24-32.
- Lin SC, Huck JH, Roberts JD, Macklin WB, Somogyi P, Bergles DE (2005) Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. *Neuron* 46:773-785.
- Liss B, Franz O, Sewing S, Bruns R, Neuhoff H, Roeper J (2001) Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *Embo J* 20:5715-5724.
- Liu QS, Xu Q, Kang J, Nedergaard M (2004) Astrocyte activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors modulates hippocampal inhibitory synaptic transmission. *Neuron Glia Biol* 1:307-316.
- Lu M, Fan Y, Tang M, Qian X, Ding J, Hu G (2011) Potentiation of D-serine involves degeneration of dopaminergic neurons in MPTP/p mouse model of Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther* 17:796-798.
- Lupfert C, Grell E, Pintschovius V, Apell HJ, Cornelius F, Clarke RJ (2001) Rate limitation of the Na(+),K(+)-ATPase pump cycle. *Biophys J* 81:2069-2081.

M

- Ma Y, Hu JH, Zhao WJ, Fei J, Yu Y, Zhou XG, Mei ZT, Guo LH (2001) Overexpression of gamma-aminobutyric acid transporter subtype I leads to susceptibility to kainic acid-induced seizure in transgenic mice. *Cell Res* 11:61-67.
- Madsen KK, White HS, Schousboe A (2009) Neuronal and non-neuronal GABA transporters as targets for antiepileptic drugs. *Pharmacol Ther* 125:394-401.
- Magarinos-Ascone C, Pazo JH, Macadar O, Buno W (2002) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus silences subthalamic neurons: a possible cellular mechanism in Parkinson's disease. *Neuroscience* 115:1109-1117.
- Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD (2000) Relationship of activity in the subthalamic nucleus-globus pallidus network to cortical electroencephalogram. *J Neurosci* 20:820-833.
- Magistretti PJ (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol* 209:2304-2311.
- Mahon S, Deniau JM, Charpier S (2001) Relationship between EEG potentials and intracellular activity of striatal and cortico-striatal neurons: an in vivo study under different anesthetics. *Cereb Cortex* 11:360-373.
- Mailly P, Charpier S, Menetrey A, Deniau JM (2003) Three-dimensional organization of the recurrent axon collateral network of the substantia nigra pars reticulata neurons in the rat. *J Neurosci* 23:5247-5257.
- Mailly P, Charpier S, Mahon S, Menetrey A, Thierry AM, Glowinski J, Deniau JM (2001) Dendritic arborizations of the rat substantia nigra pars reticulata neurons: spatial organization and relation to the lamellar compartmentation of striato-nigral projections. *J Neurosci* 21:6874-6888.
- Mallet L, Mesnage V, Houeto JL, Pelissolo A, Yelnik J, Behar C, Gargiulo M, Welter ML, Bonnet AM, Pillon B, Cornu P, Dormont D, Pidoux B, Allilaire JF, Agid Y (2002) Compulsions, Parkinson's disease, and stimulation. *Lancet* 360:1302-1304.
- Maltete D, Jodoin N, Karachi C, Houeto JL, Navarro S, Cornu P, Agid Y, Welter ML (2007) Subthalamic stimulation and neuronal activity in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neurophysiol* 97:4017-4022.

- Mana S, Chevalier G (2001) The fine organization of nigro-collicular channels with additional observations of their relationships with acetylcholinesterase in the rat. *Neuroscience* 106:357-374.
- Mandel S, Grunblatt E, Riederer P, Gerlach M, Levites Y, Youdim MB (2003) Neuroprotective strategies in Parkinson's disease : an update on progress. *CNS Drugs* 17:729-762.
- Marino MJ, Wittmann M, Bradley SR, Hubert GW, Smith Y, Conn PJ (2001) Activation of group I metabotropic glutamate receptors produces a direct excitation and disinhibition of GABAergic projection neurons in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 21:7001-7012.
- Marrero H, Orkand RK (1996) Nerve impulses increase glial intercellular permeability. *Glia* 16:285-289.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195:1356-1358.
- Matos M, Augusto E, Santos-Rodrigues AD, Schwarzschild MA, Chen JF, Cunha RA, Agostinho P (2012) Adenosine A(2A) receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. *Glia* 60:702-716.
- Matyas F, Yanovsky Y, Mackie K, Kelsch W, Misgeld U, Freund TF (2006) Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 137:337-361.
- Maurice N, Deniau JM, Glowinski J, Thierry AM (1999) Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the cortico-nigral circuits. *J Neurosci* 19:4674-4681.
- Maurice N, Thierry AM, Glowinski J, Deniau JM (2003) Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 23:9929-9936.
- McFarland NR, Haber SN (2000) Convergent inputs from thalamic motor nuclei and frontal cortical areas to the dorsal striatum in the primate. *J Neurosci* 20:3798-3813.
- McGeer PL, McGeer EG (2008) Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23:474-483.
- McGeorge AJ, Faull RL (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503-537.
- McIntyre CC, Grill WM, Sherman DL, Thakor NV (2004) Cellular effects of deep brain stimulation: model-based analysis of activation and inhibition. *J Neurophysiol* 91:1457-1469.
- Mena-Segovia J, Winn P, Bolam JP (2008) Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. *Brain Res Rev* 58:265-271.
- Michel FJ, Robillard JM, Trudeau LE (2004) Regulation of rat mesencephalic GABAergic neurones through muscarinic receptors. *J Physiol* 556:429-445.
- Middleton FA, Strick PL (2000) Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Brain Res Rev* 31:236-250.
- Morley BJ (1981) The properties of brain nicotine receptors. *Pharmacol Ther* 15:111-122.
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4926-4931.
- Mrejeru A, Wei A, Ramirez JM (2011) Calcium-activated non-selective cation currents are involved in generation of tonic and bursting activity in dopamine neurons of the substantia nigra pars compacta. *J Physiol* 589:2497-2514.
- Murer MG, Tseng KY, Kasanetz F, Belluscio M, Riquelme LA (2002) Brain oscillations, medium spiny neurons, and dopamine. *Cell Mol Neurobiol* 22:611-632.

N

- Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152:1024-1031.
- Naito A, Kita H (1994) The cortico-nigral projection in the rat: an anterograde tracing study with biotinylated dextran amine. *Brain Res* 637:317-322.

- Nakanishi H, Kita H, Kitai ST (1987) Intracellular study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an in vitro slice preparation: electrical membrane properties and response characteristics to subthalamic stimulation. *Brain Res* 437:45-55.
- Nambu A (2007) Globus pallidus internal segment. *Prog Brain Res* 160:135-150.
- Nashmi R, Xiao C, Deshpande P, McKinney S, Grady SR, Whiteaker P, Huang Q, McClure-Begley T, Lindstrom JM, Labarca C, Collins AC, Marks MJ, Lester HA (2007) Chronic nicotine cell specifically upregulates functional $\alpha 4^*$ nicotinic receptors: basis for both tolerance in midbrain and enhanced long-term potentiation in perforant path. *J Neurosci* 27:8202-8218.
- Nastuk MA, Graybiel AM (1991) Pharmacologically defined M1 and M2 muscarinic cholinergic binding sites in the cat's substantia nigra: development and maturity. *Brain Res Dev Brain Res* 61:1-10.
- Navarrete M, Perea G, Fernandez de Sevilla D, Gomez-Gonzalo M, Nunez A, Martin ED, Araque A (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol* 10:e1001259.
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Ng CH, Wang XS, Ong WY (2000) A light and electron microscopic study of the GABA transporter GAT-3 in the monkey basal ganglia and brainstem. *J Neurocytol* 29:595-603.
- Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao D, Benabid AL, Benazzouz A (2001) Intrastubthalamic injection of 6-hydroxydopamine induces changes in the firing rate and pattern of subthalamic nucleus neurons in the rat. *Synapse* 40:145-153.
- Nicholson LF, Faull RL, Waldvogel HJ, Dragunow M (1992) The regional, cellular and subcellular localization of GABAA/benzodiazepine receptors in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* 50:355-370.
- Nilius B, Owsianik G (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 12:218.
- Nimmerjahn A, Mukamel EA, Schnitzer MJ (2009) Motor behavior activates Bergmann glial networks. *Neuron* 62:400-412.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr JN, Helmchen F (2004) Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods* 1:31-37.
- Nishimura Y, Takada M, Mizuno N (1997) Topographic distribution and collateral projections of the two major populations of nigrothalamic neurons. A retrograde labeling study in the rat. *Neurosci Res* 28:1-9.
- Nishiyama A, Yang Z, Butt A (2005) Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat* 207:687-693.
- Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:295-322.
- Nitsch C, Riesenberger R (1988) Immunocytochemical demonstration of GABAergic synaptic connections in rat substantia nigra after different lesions of the striatonigral projection. *Brain Res* 461:127-142.
- Nowak LG, Bullier J (1998a) Axons, but not cell bodies, are activated by electrical stimulation in cortical gray matter. I. Evidence from chronaxie measurements. *Exp Brain Res* 118:477-488.
- Nowak LG, Bullier J (1998b) Axons, but not cell bodies, are activated by electrical stimulation in cortical gray matter. II. Evidence from selective inactivation of cell bodies and axon initial segments. *Exp Brain Res* 118:489-500.

O

- Oades RD (1987) Attention deficit disorder with hyperactivity (ADDH): the contribution of catecholaminergic activity. *Prog Neurobiol* 29:365-391.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M (2012) Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814:23-45.
- Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci* 29:547-553.

- Obeso JA, Rodriguez MC, DeLong MR (1997) Basal ganglia pathophysiology. A critical review. *Adv Neurol* 74:3-18.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Arbizu J, Gimenez-Amaya JM (2002) The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci* 17:51-55.
- Ochi M, Shiozaki S, Kase H (2004) Adenosine A(2A) receptor-mediated modulation of GABA and glutamate release in the output regions of the basal ganglia in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 127:223-231.
- Oh DJ, Dichter MA (1994) Effect of a gamma-aminobutyric acid uptake inhibitor, NNC-711, on spontaneous postsynaptic currents in cultured rat hippocampal neurons: implications for antiepileptic drug development. *Epilepsia* 35:426-430.
- Oliet SH, Mothet JP (2009) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience* 158:275-283.
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292:923-926.
- Oliet SH, Panatier A, Piet R (2006) Functional neuronal-glial anatomical remodelling in the hypothalamus. *Novartis Found Symp* 276:238-248; discussion 248-252, 275-281.
- Oliet SH, Panatier A, Piet R, Mothet JP, Poulain DA, Theodosis DT (2008) Neuron-glia interactions in the rat supraoptic nucleus. *Prog Brain Res* 170:109-117.
- Ortinski PI, Dong J, Mungenast A, Yue C, Takano H, Watson DJ, Haydon PG, Coulter DA (2010) Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nat Neurosci* 13:584-591.
- Otsuka T, Murakami F, Song WJ (2001) Excitatory postsynaptic potentials trigger a plateau potential in rat subthalamic neurons at hyperpolarized states. *J Neurophysiol* 86:1816-1825.
- Otsuka T, Abe T, Tsukagawa T, Song WJ (2004) Conductance-based model of the voltage-dependent generation of a plateau potential in subthalamic neurons. *J Neurophysiol* 92:255-264.

P

- Panatier A, Gentles SJ, Bourque CW, Oliet SH (2006) Activity-dependent synaptic plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus. *J Physiol* 573:711-721.
- Panatier A, Vallee J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785-798.
- Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS (1989) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 28:585-610.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46:143-151.
- Parent A, Hazrati LN (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20:128-154.
- Parent A, Hazrati LN (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20:91-127.
- Parent A, Mackey A, Smith Y, Boucher R (1983) The output organization of the substantia nigra in primate as revealed by a retrograde double labeling method. *Brain Res Bull* 10:529-537.
- Parent M, Levesque M, Parent A (2001) Two types of projection neurons in the internal pallidum of primates: single-axon tracing and three-dimensional reconstruction. *J Comp Neurol* 439:162-175.
- Park JB, Jo JY, Zheng H, Patel KP, Stern JE (2009) Regulation of tonic GABA inhibitory function, presympathetic neuronal activity and sympathetic outflow from the paraventricular nucleus by astroglial GABA transporters. *J Physiol* 587:4645-4660.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.
- Parri HR, Crunelli V (2003) The role of Ca²⁺ in the generation of spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations. *Neuroscience* 120:979-992.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4:803-812.

- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113-116.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17:7817-7830.
- Paukert M, Bergles DE (2006) Synaptic communication between neurons and NG2⁺ cells. *Curr Opin Neurobiol* 16:515-521.
- Pellerin L (2010) Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity. *Diabetes Metab* 36 Suppl 3:S59-63.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1997) Glutamate uptake stimulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain. *J Neurochem* 69:2132-2137.
- Percheron G, Fenelon G, Leroux-Hugon V, Fève A (1994) [History of the basal ganglia system. Slow development of a major cerebral system]. *Rev Neurol (Paris)* 150:543-554.
- Perea G, Araque A (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38:375-382.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-431.
- Petzold GC, Murthy VN (2011) Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron* 71:782-797.
- Piet R, Bonhomme R, Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH (2003) Modulation of GABAergic transmission by endogenous glutamate in the rat supraoptic nucleus. *Eur J Neurosci* 17:1777-1785.
- Pinnock RD, Dray A (1982) Differential sensitivity of presumed dopaminergic and non-dopaminergic neurones in rat substantia nigra to electrophoretically applied substance P. *Neurosci Lett* 29:153-158.
- Platel JC, Dupuis A, Boisseau S, Villaz M, Albrieux M, Brocard J (2007) Synchrony of spontaneous calcium activity in mouse neocortex before synaptogenesis. *Eur J Neurosci* 25:920-928.
- Plenz D (2003) When inhibition goes incognito: feedback interaction between spiny projection neurons in striatal function. *Trends Neurosci* 26:436-443.
- Plenz D, Herrera-Marschitz M, Kitai ST (1998) Morphological organization of the globus pallidus-subthalamic nucleus system studied in organotypic cultures. *J Comp Neurol* 397:437-457.
- Poisik OV, Shen JX, Jones S, Yakel JL (2008) Functional $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptors localize to cell bodies and proximal dendrites in the rat substantia nigra pars reticulata. *J Physiol* 586:1365-1378.
- Pollak P, Benabid AL, Limousin P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Perret J (1996) Subthalamic nucleus stimulation alleviates akinesia and rigidity in parkinsonian patients. *Adv Neurol* 69:591-594.
- Pollak P, Benabid AL, Gross C, Gao DM, Laurent A, Benazzouz A, Hoffmann D, Gentil M, Perret J (1993) [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. *Rev Neurol (Paris)* 149:175-176.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51:439-455.
- Poskanzer KE, Yuste R (2011) Astrocytic regulation of cortical UP states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18453-18458.
- Pow DV, Sullivan RK, Williams SM, Scott HL, Dodd PR, Finkelstein D (2005) Differential expression of the GABA transporters GAT-1 and GAT-3 in brains of rats, cats, monkeys and humans. *Cell Tissue Res* 320:379-392.
- Prensa L, Gimenez-Amaya JM, Parent A, Bernacer J, Cebrian C (2009) The nigrostriatal pathway: axonal collateralization and compartmental specificity. *J Neural Transm Suppl* 73:49-58.
- Puopolo M, Raviola E, Bean BP (2007) Roles of subthreshold calcium current and sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 27:645-656.

R

- Radnikow G, Misgeld U (1998) Dopamine D1 receptors facilitate GABAA synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 18:2009-2016.
- Ragsdale CW, Jr., Graybiel AM (1990) A simple ordering of neocortical areas established by the compartmental organization of their striatal projections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6196-6199.
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.
- Rappold PM, Tieu K (2010) Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 7:413-423.
- Richards CD, Shiroyama T, Kitai ST (1997) Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* 80:545-557.
- Rick CE, Stanford IM, Lacey MG (1995) Excitation of rat substantia nigra pars reticulata neurons by 5-hydroxytryptamine in vitro: evidence for a direct action mediated by 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors. *Neuroscience* 69:903-913.
- Robledo P, Feger J (1990) Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: electrophysiological data. *Brain Res* 518:47-54.
- Roessmann U, Velasco ME, Sindely SD, Gambetti P (1980) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain Res* 200:13-21.
- Rohrbacher J, Ichinohe N, Kitai ST (2000) Electrophysiological characteristics of substantia nigra neurons in organotypic cultures: spontaneous and evoked activities. *Neuroscience* 97:703-714.
- Rommelfanger KS, Wichmann T (2010) Extrastriatal dopaminergic circuits of the Basal Ganglia. *Front Neuroanat* 4:139.
- Romo-Parra H, Misgeld U, Yanovsky Y (2009) Regular firing of a single output neuron reduces its own inhibition through endocannabinoids in substantia nigra pars reticulata of juvenile mice. *Neuroscience* 160:596-605.
- Rossi L, Marceglia S, Foffani G, Cogiamanian F, Tamma F, Rampini P, Barbieri S, Bracchi F, Priori A (2008) Subthalamic local field potential oscillations during ongoing deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 76:512-521.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73-84.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713-725.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Rye DB, Saper CB, Lee HJ, Wainer BH (1987) Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *J Comp Neurol* 259:483-528.

S

- Santello M, Cali C, Bezzi P (2012) Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv Exp Med Biol* 970:307-331.
- Sanudo-Pena MC, Walker JM (1997) Role of the subthalamic nucleus in cannabinoid actions in the substantia nigra of the rat. *J Neurophysiol* 77:1635-1638.
- Saper CB, Loewy AD (1982) Projections of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat: evidence for additional extrapyramidal circuitry. *Brain Res* 252:367-372.
- Sasaki T, Kuga N, Namiki S, Matsuki N, Ikegaya Y (2011) Locally synchronized astrocytes. *Cereb Cortex* 21:1889-1900.
- Sato F, Lavalley P, Levesque M, Parent A (2000) Single-axon tracing study of neurons of the external segment of the globus pallidus in primate. *J Comp Neurol* 417:17-31.
- Savasta M, Carcenac C, Boulet S (2011) Diagnosis and Treatment of Parkinson's Disease.

- Scanziani M, Salin PA, Vogt KE, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* 385:630-634.
- Scarnati E, Campana E, Pacitti C (1984) Pedunculopontine-evoked excitation of substantia nigra neurons in the rat. *Brain Res* 304:351-361.
- Scarnati E, Proia A, Di Loreto S, Pacitti C (1987) The reciprocal electrophysiological influence between the nucleus tegmenti pedunculopontinus and the substantia nigra in normal and decorticated rats. *Brain Res* 423:116-124.
- Scemes E, Spray DC (2012) Extracellular K(+) and Astrocyte Signaling via Connexin and Pannexin Channels. *Neurochem Res* 2012:6.
- Schipke CG, Haas B, Kettenmann H (2008) Astrocytes discriminate and selectively respond to the activity of a subpopulation of neurons within the barrel cortex. *Cereb Cortex* 18:2450-2459.
- Schousboe A (2003) Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res* 28:347-352.
- Schummers J, Yu H, Sur M (2008) Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science* 320:1638-1643.
- Schwyn RC, Fox CA (1974) The primate substantia nigra: a Golgi and electron microscopic study. *J Hirnforsch* 15:95-126.
- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194-206.
- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R (2006) GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci* 26:5370-5382.
- Sharott A, Magill PJ, Harnack D, Kupsch A, Meissner W, Brown P (2005) Dopamine depletion increases the power and coherence of beta-oscillations in the cerebral cortex and subthalamic nucleus of the awake rat. *Eur J Neurosci* 21:1413-1422.
- Shen KZ, Johnson SW (1997) Presynaptic GABAB and adenosine A1 receptors regulate synaptic transmission to rat substantia nigra reticulata neurones. *J Physiol* 505 (Pt 1):153-163.
- Shen KZ, Johnson SW (2006) Subthalamic stimulation evokes complex EPSCs in the rat substantia nigra pars reticulata in vitro. *J Physiol* 573:697-709.
- Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS (2012) TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* 15:70-80.
- Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-896.
- Smith Y, Bolam JP (1989) Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res* 493:160-167.
- Smith Y, Bolam JP (1990) The output neurones and the dopaminergic neurones of the substantia nigra receive a GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 296:47-64.
- Smith Y, Bolam JP (1991) Convergence of synaptic inputs from the striatum and the globus pallidus onto identified nigrocollicular cells in the rat: a double anterograde labelling study. *Neuroscience* 44:45-73.
- Smith Y, Bolam JP, Von Krosigk M (1990) Topographical and Synaptic Organization of the GABA-Containing Pallidosubthalamic Projection in the Rat. *Eur J Neurosci* 2:500-511.
- Spacek J (1985) Three-dimensional analysis of dendritic spines. III. Glial sheath. *Anat Embryol (Berl)* 171:245-252.
- Spann BM, Grofova I (1991) Nigropedunculopontine projection in the rat: an anterograde tracing study with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol* 311:375-388.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839-840.
- Stanford IM, Lacey MG (1996) Differential actions of serotonin, mediated by 5-HT1B and 5-HT2C receptors, on GABA-mediated synaptic input to rat substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *J Neurosci* 16:7566-7573.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395:347-353.

Szabo B, Wallmichrath I, Mathonia P, Pfreundtner C (2000) Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 97:89-97.

T

- Tai CH, Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross C, Benazzouz A (2003) Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridges neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *FASEB J* 17:1820-1830.
- Takakusaki K, Shiroyama T, Yamamoto T, Kitai ST (1996) Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *J Comp Neurol* 371:345-361.
- Takasaki C, Okada R, Mitani A, Fukaya M, Yamasaki M, Fujihara Y, Shirakawa T, Tanaka K, Watanabe M (2008) Glutamate transporters regulate lesion-induced plasticity in the developing somatosensory cortex. *J Neurosci* 28:4995-5006.
- Takata N, Hirase H (2008) Cortical layer 1 and layer 2/3 astrocytes exhibit distinct calcium dynamics in vivo. *PLoS One* 3:e2525.
- Takayasu Y, Iino M, Kakegawa W, Maeno H, Watase K, Wada K, Yanagihara D, Miyazaki T, Komine O, Watanabe M, Tanaka K, Ozawa S (2005) Differential roles of glial and neuronal glutamate transporters in Purkinje cell synapses. *J Neurosci* 25:8788-8793.
- Tan SK, Temel Y, Blokland A, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V (2006) The subthalamic nucleus: From response selection to execution. *J Chem Neuroanat* 31:155-161.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- Temel Y, Blokland A, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V (2005) The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Prog Neurobiol* 76:393-413.
- Tersigni TJ, Rosenberg HC (1996) Local pressure application of cannabinoid agonists increases spontaneous activity of rat substantia nigra pars reticulata neurons without affecting response to iontophoretically-applied GABA. *Brain Res* 733:184-192.
- Theis M, Giaume C (2012) Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res* 2012:9.
- Thobois S, Mertens P, Guenot M, Hermier M, Mollion H, Bouvard M, Chazot G, Broussolle E, Sindou M (2002) Subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease: clinical evaluation of 18 patients. *J Neurol* 249:529-534.
- Threlfell S, Cragg SJ, Kallo I, Turi GF, Coen CW, Greenfield SA (2004) Histamine H3 receptors inhibit serotonin release in substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 24:8704-8710.
- Tison F, Dartigues JF, Dubes L, Zuber M, Alperovitch A, Henry P (1994) Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: a population study in Gironde, France. *Acta Neurol Scand* 90:111-115.
- Tovey SC, Brighton PJ, Willars GB (2005) Confocal microscopy: theory and applications for cellular signaling. *Methods Mol Biol* 312:57-85.
- Trotter J, Karram K, Nishiyama A (2010) NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev* 63:72-82.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-885.
- Tseng KY, Kasanetz F, Kargieman L, Pazo JH, Murer MG, Riquelme LA (2001) Subthalamic nucleus lesions reduce low frequency oscillatory firing of substantia nigra pars reticulata neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 904:93-103.
- Tsukada S, Iino M, Takayasu Y, Shimamoto K, Ozawa S (2005) Effects of a novel glutamate transporter blocker, (2S, 3S)-3-[3-[4-(trifluoromethyl)benzoylamino]benzyloxy]aspartate (TFB-TBOA), on activities of hippocampal neurons. *Neuropharmacology* 48:479-491.
- Tzingounis AV, Wadiche JI (2007) Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 8:935-947.

V

- Vedam-Mai V, van Battum EY, Kamphuis W, Feenstra MG, Denys D, Reynolds BA, Okun MS, Hol EM (2012) Deep brain stimulation and the role of astrocytes. *Mol Psychiatry* 17:124-131, 115.
- Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C (1995) Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature* 376:590-594.
- Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19:6897-6906.
- Verkhratsky A, Kettenmann H (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci* 19:346-352.
- Verkhratsky A, Steinhauser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32:380-412.
- Verkhratsky A, Kirchhoff F (2007) NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* 13:28-37.
- Verkhratsky A, Butt A (2007) Glial Neurobiology.
- Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78:99-141.
- Verkhratsky A, Rodriguez JJ, Parpura V (2011a) Calcium signalling in astroglia. *Mol Cell Endocrinol* 353:45-56.
- Verkhratsky A, Parpura V, Rodriguez JJ (2011b) Where the thoughts dwell: the physiology of neuronal-glial "diffuse neural net". *Brain Res Rev* 66:133-151.
- Verkhratsky A, Rodriguez JJ, Parpura V (2012) Neurotransmitters and Integration in Neuronal-Astroglial Networks. *Neurochem Res* 2012:3.
- Vila M, Jackson-Lewis V, Guegan C, Wu DC, Teismann P, Choi DK, Tieu K, Przedborski S (2001) The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 14:483-489.
- Vilaro MT, Cortes R, Mengod G (2005) Serotonin 5-HT₄ receptors and their mRNAs in rat and guinea pig brain: distribution and effects of neurotoxic lesions. *J Comp Neurol* 484:418-439.
- Villalba RM, Smith Y (2011) Neuroglial plasticity at striatal glutamatergic synapses in Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci* 5:68.
- Virchow R (1858) Die cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische and pathologische Gewebelehre.
- Visser-Vandewalle V, Temel Y, Boon P, Vreeling F, Colle H, Hoogland G, Groenewegen HJ, van der Linden C (2003) Chronic bilateral thalamic stimulation: a new therapeutic approach in intractable Tourette syndrome. Report of three cases. *J Neurosurg* 99:1094-1100.
- Vitvitsky V, Garg SK, Banerjee R (2011) Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 286:32002-32010.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- von Krosigk M, Smith Y, Bolam JP, Smith AD (1992) Synaptic organization of GABAergic inputs from the striatum and the globus pallidus onto neurons in the substantia nigra and retrorubral field which project to the medullary reticular formation. *Neuroscience* 50:531-549.
- Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci* 27:468-474.

W

- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29:3974-3980.
- Wallmichrath I, Szabo B (2002) Analysis of the effect of cannabinoids on GABAergic neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365:326-334.
- Walter BL, Vitek JL (2004) Surgical treatment for Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 3:719-728.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T, Stella N (2002) Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem* 277:20869-20876.
- Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36:291-300.

- Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86:342-367.
- Wang F, Smith NA, Xu Q, Fujita T, Baba A, Matsuda T, Takano T, Bekar L, Nedergaard M (2012) Astrocytes modulate neural network activity by Ca^{2+} -dependent uptake of extracellular K^{+} . *Sci Signal* 5:ra26.
- Wang TF, Zhou C, Tang AH, Wang SQ, Chai Z (2006) Cellular mechanism for spontaneous calcium oscillations in astrocytes. *Acta Pharmacol Sin* 27:861-868.
- Wang Z, Haydon PG, Yeung ES (2000) Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Anal Chem* 72:2001-2007.
- Weinberger M, Hutchison WD, Dostrovsky JO (2009) Pathological subthalamic nucleus oscillations in PD: can they be the cause of bradykinesia and akinesia? *Exp Neurol* 219:58-61.
- Welter ML, Houeto JL, Bonnet AM, Bejjani PB, Mesnage V, Dormont D, Navarro S, Cornu P, Agid Y, Pidoux B (2004) Effects of high-frequency stimulation on subthalamic neuronal activity in parkinsonian patients. *Arch Neurol* 61:89-96.
- Wenzel J, Lammert G, Meyer U, Krug M (1991) The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. *Brain Res* 560:122-131.
- Wichmann T, DeLong MR (2006) Basal ganglia discharge abnormalities in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 70:21-25.
- Wichmann T, Bergman H, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. I. Functional properties in intact animals. *J Neurophysiol* 72:494-506.
- Wichmann T, Bergman H, Starr PA, Subramanian T, Watts RL, DeLong MR (1999) Comparison of MPTP-induced changes in spontaneous neuronal discharge in the internal pallidal segment and in the substantia nigra pars reticulata in primates. *Exp Brain Res* 125:397-409.
- Wigley R, Hamilton N, Nishiyama A, Kirchhoff F, Butt AM (2007) Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons. *J Anat* 210:661-670.
- Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M (2006) Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17513-17518.
- Wilson CJ, Callaway JC (2000) Coupled oscillator model of the dopaminergic neuron of the substantia nigra. *J Neurophysiol* 83:3084-3100.
- Windels F, Carcenac C, Poupard A, Savasta M (2005) Pallidal origin of GABA release within the substantia nigra pars reticulata during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25:5079-5086.
- Windels F, Bruet N, Poupard A, Feuerstein C, Bertrand A, Savasta M (2003) Influence of the frequency parameter on extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid in substantia nigra and globus pallidus during electrical stimulation of subthalamic nucleus in rats. *J Neurosci Res* 72:259-267.
- Windels F, Bruet N, Poupard A, Urbain N, Chouvet G, Feuerstein C, Savasta M (2000) Effects of high frequency stimulation of subthalamic nucleus on extracellular glutamate and GABA in substantia nigra and globus pallidus in the normal rat. *Eur J Neurosci* 12:4141-4146.
- Witcher MR, Kirov SA, Harris KM (2007) Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia* 55:13-23.
- Wittmann M, Hubert GW, Smith Y, Conn PJ (2001a) Activation of metabotropic glutamate receptor 1 inhibits glutamatergic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 105:881-889.
- Wittmann M, Marino MJ, Bradley SR, Conn PJ (2001b) Activation of group III mGluRs inhibits GABAergic and glutamatergic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurophysiol* 85:1960-1968.
- Wolosker H (2007) NMDA receptor regulation by D-serine: new findings and perspectives. *Mol Neurobiol* 36:152-164.
- Wolters E (2008) Variability in the clinical expression of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 266:197-203.

Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA (2003) Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci* 23:3176-3185.

XYZ

Xu-Friedman MA, Harris KM, Regehr WG (2001) Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 21:6666-6672.

Xu G, Wang W, Kimelberg HK, Zhou M (2010) Electrical coupling of astrocytes in rat hippocampal slices under physiological and simulated ischemic conditions. *Glia* 58:481-493.

Xu K, Bastia E, Schwarzschild M (2005) Therapeutic potential of adenosine A(2A) receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacol Ther* 105:267-310.

Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15194-15199.

Yanovsky Y, Mades S, Misgeld U (2003) Retrograde signaling changes the venue of postsynaptic inhibition in rat substantia nigra. *Neuroscience* 122:317-328.

Yanovsky Y, Zhang W, Misgeld U (2005) Two pathways for the activation of small-conductance potassium channels in neurons of substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 136:1027-1036.

Yarnall A, Rochester L, Burn DJ (2011) The interplay of cholinergic function, attention, and falls in Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:2496-2503.

Ye G, Tse AC, Yung W (1997) Taurine inhibits rat substantia nigra pars reticulata neurons by activation of GABA- and glycine-linked chloride conductance. *Brain Res* 749:175-179.

Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci* 23:3588-3596.

Yelnik J, Francois C, Percheron G, Heyner S (1987) Golgi study of the primate substantia nigra. I. Quantitative morphology and typology of nigral neurons. *J Comp Neurol* 265:455-472.

Yoshida M, Precht W (1971) Monosynaptic inhibition of neurons of the substantia nigra by caudato-nigral fibers. *Brain Res* 32:225-228.

Zhang LL, Chen L, Xue Y, Yung WH (2008) Modulation of synaptic GABAA receptor function by zolpidem in substantia nigra pars reticulata. *Acta Pharmacol Sin* 29:161-168.

Zhou FM, Lee CR (2011) Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience*.

Zhou FW, Matta SG, Zhou FM (2008) Constitutively active TRPC3 channels regulate basal ganglia output neurons. *J Neurosci* 28:473-482.

Zhou FW, Xu JJ, Zhao Y, LeDoux MS, Zhou FM (2006) Opposite functions of histamine H1 and H2 receptors and H3 receptor in substantia nigra pars reticulata. *J Neurophysiol* 96:1581-1591.

Zhou FW, Jin Y, Matta SG, Xu M, Zhou FM (2009) An ultra-short dopamine pathway regulates basal ganglia output. *J Neurosci* 29:10424-10435.

Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE (2007) Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 10:321-330.

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.